



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Μελέτη του ρόλου της φωσφορυλίωσης στον υποκυτταρικό
εντοπισμό και δραστηριότητα του επαγόμενου από την υποξία
παράγοντα 1α (HIF-1α) »**

Καραγιώτα Αγγελική

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ηλίας Μυλωνής, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Επιβλέπων
- Γεώργιος Σίμος, Καθηγητής Βιοχημείας
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού
Διπλώματος Ειδίκευσης στη Βιοχημεία

Λάρισα, Οκτώβριος 2014



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**« Study of the role of phosphorylation in the subcellular localization
and activity of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) »**

Karagiota Angeliki

Τριμελής εξεταστική επιτροπή: (Times New Roman, 12 pt)

- Ilias Mylonis, Assistant Professor of Biochemistry
- Georgios Simos, Professor of Biochemistry
- Anastasios Germenis, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in
partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biochemistry

Larissa, October 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΥΠΟΞΙΑ	9
1.2. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF.....	9
1.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ	
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ 1α (HIF-1α)	12
1.3.1. Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση	13
1.3.2. Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση	15
1.3.2.1. Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής	16
1.3.2.2. Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης	16
1.3.2.3. Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	17
1.3.3. Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα	21
1.4. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ ΜΑΡΚ	22
1.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	24
2. ΣΚΟΠΟΣ	28
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1. ΥΛΙΚΑ	29
3.1.1. Βακτηριακά στελέχη	29
3.1.2. Κυτταρικές σειρές	29
3.1.3. Θρεπτικά υγρά – Οροί – Αντιβιοτικά	29
3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς	29
3.1.5. Χημικά αντιδραστήρια	31
3.1.6. Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας	31
3.1.7. Αντισώματα	31
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	32
3.2.1. Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων	
.....	32

3.2.2. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	32
3.2.3. Ηλεκτροφόρηση και απομόνωση DNA σε πηκτή αγαρόζης	35
3.2.4. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i>	36
3.2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση	37
3.2.6. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας	37
3.2.7. Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	38
3.2.8. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων	39
3.2.9. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση κι ανοσοαποτύπωση κατά Western	40
3.2.9.1. Λύση των κυττάρων και παρασκευή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	40
3.2.9.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford	41
3.2.9.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	42
3.2.9.4. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	46
3.2.9.5. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών	47
3.2.10. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	49
3.2.11. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας	50
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
4.1. Κλωνοποίηση των διαφόρων μορφών του πλήρους μεγέθους HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA 3.1 FlagC	53
4.1.1. Κατεργασία του HIF-1α και του πλασμιδιακού φορέα με το ίδιο ένζυμο και σύνδεσή τους	53
4.1.2. Απομόνωση μικρής κλίμακας του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pcDNA FlagC - HIF-1α και έλεγχος της επιτυχίας κλωνοποίησης	56
4.1.3. Καθαρισμός μεσαίας κλίμακας του pcDNA FlagC – HIF-1α.....	61
4.2. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας τις κατασκευές pCMV Flag – HIF-1α	64

4.3. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa και HEK293T χρησιμοποιώντας τις κατασκευές pcDNA FlagC – HIF-1α	66
4.4. Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α	69
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Κλινικές εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής”, υπό την επίβλεψη του Επικουρου Καθηγητή Βιοχημείας κ. Μυλωνή Ηλία, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση της εργασίας, για την άψογη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του τόσο κατά τη διεξαγωγή της εργασίας, όσο και καθ’ όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, αλλά και για την εμπιστοσύνη και την υπομονή του. Πάνω από όλα όμως τον ευχαριστώ για όλα όσα έμαθα κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Σίμο Γεώργιο, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας.

Ευχαριστώ τον κ. Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και υπεύθυνο του Π.Μ.Σ. για την άψογη διεξαγωγή του προγράμματος και τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της εργασίας μου, ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία, στα πρώτα αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους μεταπτυχιακούς φοιτητές, Παπαθανασίου Μάριον, Μπαρού Ζωή και Γραμματικόπουλο Αλέξανδρο για την άψογη συνεργασία και την πολύ καλή παρέα τους. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Δρακούλη Σωτηρία, Κούρτη Μαρία και Πάγγου Ευανθία, Ριμενίδη Γεωργία, Γκοτινάκου Ιωάννα καθώς και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μπεφάνη Χριστίνα για την βοήθεια που μου πρόσφεραν, το ενδιαφέρον και τη στήριξή τους σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Επίσης, για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που υπήρχε μέσα στο εργαστήριο, αλλά και για την καλή παρέα έξω από αυτό, και τη φιλία τους.

Πάνω από όλα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, για την αγάπη, τη φροντίδα και την πολύτιμη καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου, καθώς και τους φίλους μου που έχουν αποτελέσει σημαντικό ηθικό στήριγμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας, HIF-1 είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την απόκριση στην υποξία και εμπλέκεται σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Η επαγόμενη υπομονάδα HIF-1α ρυθμίζεται από το οξυγόνο αλλά και από ανεξάρτητους μηχανισμούς. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του HIF-1α παίζουν η υδροξυλίωση και η φωσφορυλίωση.

Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης μελέτης που διερευνά την φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAPK στις θέσεις Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της ρύθμισης του HIF-1α από τις p44/p42 MAPK στη δράση του, κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς που εκφράζουν διάφορες πλήρους μεγέθους μορφές του HIF-1α σε σύντηξη με την FLAG αλληλουχία και με αυτές επιμολύνθηκαν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Εκτός από τον αγρίου τύπου HIF-1α μελετήθηκαν οι μεταλλαγμένες του μορφές στις οποίες έχει γίνει αλλαγή είτε των θέσεων φωσφορυλίωσης από τις p44/p42 MAPK (Ser641/643 σε Ala), είτε του NES (Ile637/Leu638/Ile639 σε Ala), ή συνδυασμός των δύο προηγούμενων μορφών (IA/SA), καθώς και η φωσφομιμητική μετάλλαξη (S641 σε Glu) η οποία μιμείται το φορτίο της φωσφορυλιωμένης σερίνης. Οι μορφές αυτές, ελέγχθηκαν ως προς τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό, την έκφραση και τη μεταγραφική τους ενεργότητα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αλληλουχία σύντηξης FLAG δεν επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των διαφόρων μορφών του HIF-1α, όπως παρατηρήθηκε παλαιότερα [1] για τις ίδιες μορφές του HIF-1α που ήταν σε σύντηξη με την GFP. Σύμφωνα με αυτά όλες οι μορφές εντοπίστηκαν στον πυρήνα, εκτός της SA μορφής που εντοπίστηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα.

Η έκφραση και μεταγραφική ενεργότητα των μορφών SA, SE και IA ήταν σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου που αφορούσαν τις μορφές του HIF-1α σε σύντηξη με την GFP. Αντίθετα, η μορφή IA/SA παρουσίασε μικρότερη έκφραση και πολύ χαμηλή ενεργότητα, γεγονός που οφείλεται πιθανά στην αστάθεια της μορφής αυτής όταν βρίσκεται σε σύντηξη με την αλληλουχία FLAG.

ABSTRACT

Hypoxia inducible factor 1, HIF-1, is a heterodimeric transcription factor regulating the cellular response to hypoxia and it is implicated in many pathological conditions including cancer. Its inducible subunit, HIF-1 α , is controlled by oxygen levels as well as by various oxygen-independent mechanisms. Post-translational modifications like hydroxylation and phosphorylation play a very important role in HIF-1 α regulation.

The present study follows previous research performed in the Laboratory of Biochemistry that investigates the phosphorylation of serines 641/643 of HIF-1 α by p44/42 MAPK. Plasmid vectors expressing different forms of full length HIF-1 α in fusion with the FLAG sequence were constructed and human cell lines were transiently transfected, in order to further examine the role of the p44/p42 MAPK regulation in the activity of HIF-1 α . Besides wild type HIF-1 α , mutant forms were constructed by modifying either the phosphorylation sites (both Ser641/643 to Ala), either three hydrophobic residues inside the NES (triple mutation Ile637/Leu638/Ile639 to Ala), or their combination (IA/SA). Also, the phosphomimetic mutation (Ser641 to Glu), which mimics the charge of phosphorylated serine, was constructed. These forms were tested for their subcellular localization, their expression and their transcriptional activity.

The results showed that the fusion sequence FLAG does not affect the subcellular localization of the different HIF-1 α forms, as observed previously (Mylonis et al., 2008) for the same forms fused with GFP. Accordingly, all HIF-1 α forms were localized inside the nucleus, apart from SA form that was predominantly cytoplasmic.

The protein expression and transcriptional activity of SA, SE and IA forms agree with the previous results taken with the GFP fused HIF-1 α forms. On the contrary, the IA/SA form exhibits much lower expression levels and minimal transcriptional activity, which is probably due to the instability of this form when it is fused to FLAG sequence.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΥΠΟΞΙΑ

Ως υποξία ορίζεται η μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου σε ένα κύτταρο, έναν ιστό ή έναν οργανισμό. Η υποξία εμφανίζεται σε φυσιολογικές καταστάσεις στον ανθρώπινο οργανισμό κι αποτελεί σημαντικό εξωκυττάριο ερέθισμα για την ομαλή εμβρυογένεση, τη διατήρηση της πολυδυναμίας των στελεχιαίων κυττάρων και την ερυθροποίηση. Παρόλα αυτά, πέρα από τις φυσιολογικές λειτουργίες της, η υποξία είναι χαρακτηριστικό πολλών παθολογικών καταστάσεων.

Οι οργανισμοί κατά την εξέλιξη έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς, διατήρησης της ομοιοστασίας τους σε επίπεδο κυττάρων και ιστών. Κάποιοι από τους μηχανισμούς αυτούς παρέχουν στα κύτταρα τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται τις μεταβολές της συγκέντρωσης του οξυγόνου και να προσαρμόζονται σε αυτές. Έτσι τα κύτταρα, όταν βρεθούν σε υποξικό περιβάλλον, αποκρίνονται μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία μεταξύ άλλων, ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την αγγειογένεση και τον θάνατο.

Η υποξία περιλαμβάνει μια γρήγορη φάση, κατά την οποία συμβαίνουν γρήγορες και παροδικές αποκρίσεις μέσω μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, και μια χρόνια φάση στην οποία συμβαίνουν καθυστερημένες, αλλά με διάρκεια, αλλαγές στη μετάφραση των γονιδίων και στην πρωτεϊνοσύνθεση [2].

1.2. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ HIF

Μεγάλο μέρος των αποκρίσεων των κυττάρων στην υποξία διαμεσολαβείται από μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων γνωστών ως παραγόντων που επάγονται από την υποξία (Hypoxia Inducible Factors - HIFs) [3]. Τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι υπεύθυνα για πρωταρχικές αποκρίσεις σε υποξικό στρες σε φυσιολογικά και μετασχηματισμένα κύτταρα [4].

Οι HIFs είναι πρωτεΐνες με βασική δομή έλικα-βρόγχο-έλικα και ανήκουν στην οικογένεια Per-ARNT-Sim (bHLH - PAS). Εμφανίζουν τη μεταγραφική τους δράση ως ετεροδιμερή σύμπλοκα, αποτελούμενα από μια α -υπομονάδα, η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται από το οξυγόνο, και μια σταθερά εκφραζόμενη β -υπομονάδα. Στα θηλαστικά απαντώνται 3 ισομορφές της α -υπομονάδας, οι οποίες κωδικοποιούνται από 3 γονίδια, HIF-1 α , HIF-2 α (EPAS1) και HIF-3 α (IPAS). Η β -υπομονάδα είναι

γνωστή ως HIF-1 β ή ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) [3, 4].

Σε συνθήκες υποξίας η α -υπομονάδα σταθεροποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα. Εκεί συνδέεται με τον ARNT και το ετεροδιμερές προσδένεται στο DNA, στην αλληλουχία 5'-(A/G)CGTG-3' των στοιχείων απόκρισης στην υποξία (HRE), και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων της υποξίας. Τα HRE είναι τοποθετημένα στους προαγωγείς ή ενισχυτές των γονιδίων αυτών [3]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων απόκρισης στην υποξία, με σημαντικότερα τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της προμήθειας και εξισορρόπησης της συγκέντρωσης του οξυγόνου στα κύτταρα. Οι HIF ενεργοποιούν γονίδια σημαντικά για τον έλεγχο του μεταβολισμού, τα οποία διαμεσολαβούν την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων κυρίως ενεργοποιώντας τη γλυκόλυση, μακριά από την απαίτηση υψηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν σχεδόν όλα τα γλυκολυτικά ένζυμα ρυθμίζονται θετικά από τους HIF. Επίσης, ρυθμίζουν γονίδια στόχους που αυξάνουν την πρόσληψη οξυγόνου, όπως η ερυθροποιητίνη (EPO), ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) και οι υποδοχείς τους [5-7].

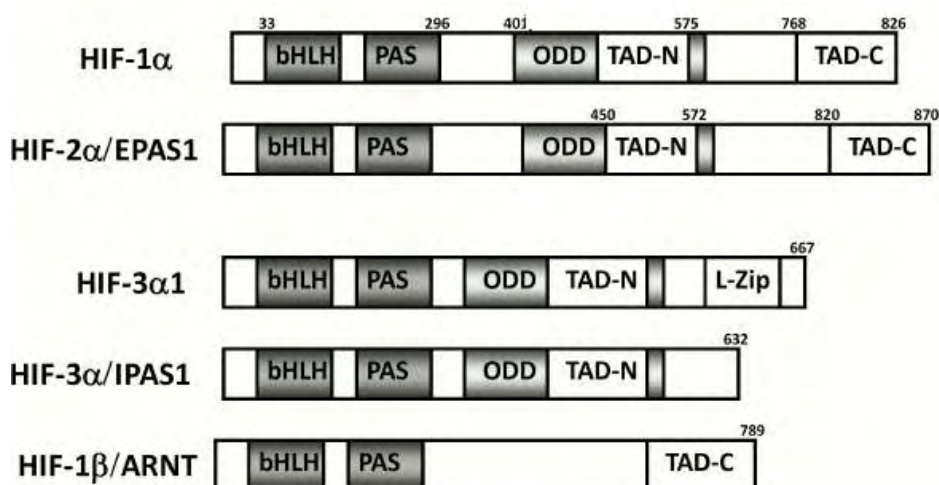
Ο HIF-2 α παρουσιάζει υψηλή ομολογία στην αλληλουχία με τον HIF-1 α , και λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο. Ετεροδιμερίζεται επίσης με τον ARNT κάτω από υποξικές συνθήκες, και διεγείρει την έκφραση τόσο κοινών όσο και διαφορετικών γονιδίων στόχων [4]. Η τρίτη γνωστή α -υπομονάδα, HIF-3 α , εμφανίζει μικρότερη ομοιότητα, καθώς και ξεχωριστά λειτουργικά χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τις HIF-1 α και HIF-2 α . Είναι ενδιαφέρον ότι υπάρχουν τουλάχιστον έξι παραλλαγές της HIF-3 α , οι οποίες δημιουργήθηκαν μέσω εναλλακτικού ματίσματος, και εμφανίζουν ποικίλη ευαισθησία στο οξυγόνο και ικανότητα διμερισμού με τον ARNT, καθώς και διαφορετικές μεταγραφικές ρυθμιστικές λειτουργίες [8, 9]. Βρέθηκε ότι η μορφή HIF-3 α 4 δεν είναι ούτε ευαίσθητη στο οξυγόνο, ούτε διαθέτει την ικανότητα ενεργοποίησης, αλλά μάλλον λειτουργεί ως ένας κυρίαρχος αρνητικός ρυθμιστής της επαγόμενης από την υποξία έκφρασης των γονιδίων-στόχων του HIF, παρεμποδίζοντας τον HIF-1 α να διμεριστεί με τον ARNT [10, 11].

Η οικογένεια των HIFs έχει μία συντηρημένη κατανομή της δομής των πρωτεϊνών σε υποπεριοχές. Οι 3 α -ισομορφές όπως και ο ARNT φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια περιοχή βασικών αμινοξέων την bHLH (έλικα-βρόγχος-έλικα), η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνδεση με το DNA και την περιοχή PAS, με

τις -A και -B υποπεριοχές, που διαμεσολαβούν τον ετεροδιμερισμό. Στο καρβοξυτελικό τους άκρο, οι HIF-1α και HIF-2α φέρουν δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής - TADs (Transactivation Domains), N-TAD και C-TAD, οι οποίες απαιτούνται για την επαγωγή των γονιδίων στόχων τους. Τέλος η οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση στηρίζεται στη δομική περιοχή ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain), η οποία εντοπίζεται στο κέντρο των α-υπομονάδων και αλληλεπικαλύπτεται με ένα μέρος της N-TAD περιοχής [3].

Οι περιοχές bHLH και PAS παρουσιάζουν υψηλή συντήρηση τόσο στην αλληλουχία, όσο και στη λειτουργία μεταξύ των HIFs. Συγκεκριμένα, οι PAS περιοχές των HIF-1α και HIF-2α εμφανίζουν περίπου 70% ομοιότητα, οι bHLH περιοχές τους είναι κατά 85% ταυτόσημες. Συγκριτικά, οι bHLH και PAS περιοχές του HIF-3α έχουν αντίστοιχα 74% και 52-58% ομοιότητα με τους HIF-1α και HIF-2α [3].

Πολλές από τις ισομορφές του HIF-3α φέρουν την N-TAD, αλλά τους λείπει η C-TAD περιοχή. Παρόλα αυτά στο καρβοξυτελικό τους άκρο φέρουν ένα διαφορετικό μοτίβο, φερμουάρ λευκίνης, η λειτουργία του οποίου δεν είναι γνωστή [9, 12]. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ισομορφή HIF-3α4 δεν έχει καθόλου TAD περιοχές και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α [10].



Εικόνα 1.1: Οι δομικές επικράτειες των μελών της οικογένειας των HIF. Οι πρωτεΐνες HIF αποτελούνται από διάφορες συντηρημένες περιοχές που εμπλέκονται στη σύνδεση τους με το DNA (έλικα-βρόχος-έλικα, bHLH), την αλληλεπίδραση τους με τον ARNT (PAS-A και PAS-B), την οξυγόνο-εξαρτώμενη αποικοδόμηση τους (ODD) και την μεταγραφική ενεργοποίηση (N-TAD, C-TAD) [3].

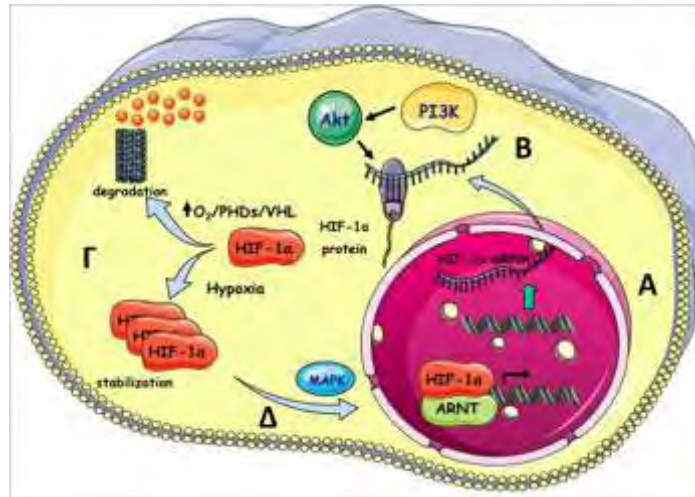
1.3. Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΞΙΑ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ

1α (HIF-1α)

Ο HIF-1 είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε το 1992, μέσω της ανάλυσης των μοριακών μηχανισμών επαγωγής του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (EPO) [13]. Ο HIF-1α αποτελείται από 826 αμινοξέα και η αλληλουχία του είναι συντηρημένη, καθώς εμφανίζει 90% ομολογία ανάμεσα στον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο.

Ο HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, μέσω της επαγωγής γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά οξυγόνου. Επιπλέον, επάγει την έκφραση γονιδίων του μεταβολισμού, επιτρέποντας στα κύτταρα να επιβιώνουν σε συνθήκες υποξίας ενώ, τέλος, συνδέεται και με παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος, τον οποίο προωθεί.

Ο HIF-1α εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους. Η σύνθεση της πρωτεΐνης του είναι συνεχής, αλλά η ενεργοποίηση της δράσης του HIF-1α είτε σε υποξικές, είτε σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης περνάει από πολλά στάδια και κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η μεταγραφή του γονιδίου του, η σύνθεση του, η σταθεροποίησή του, η είσοδος του στον πυρήνα, ο διμερισμός του με τον ARNT, η πρόσδεση στο DNA και η αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες της μεταγραφής. Αν ληφθεί υπόψη ότι όλες αυτές οι διαδικασίες υπόκεινται σε ρύθμιση τότε είναι κατανοητό ότι η ρύθμιση του HIF-1α είναι πολύπλοκη και διεκπεραιώνεται από ποικίλους μηχανισμούς, οι οποίοι μπορεί να εξαρτώνται από την παρουσία του οξυγόνου ή να λειτουργούν ανεξάρτητα από αυτό.

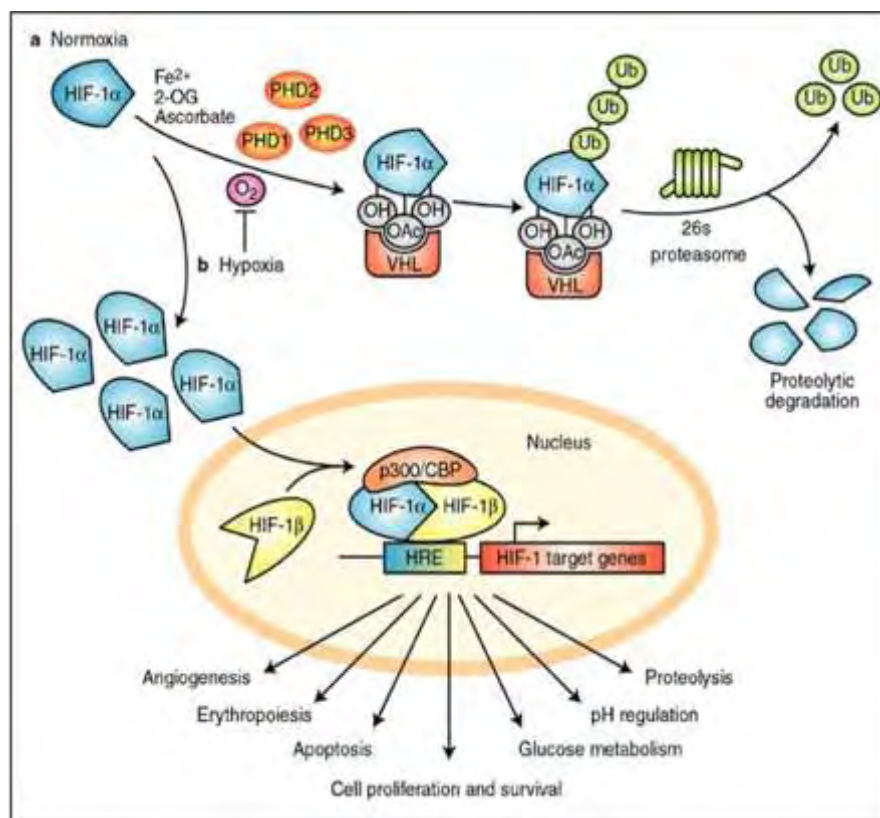


Εικόνα 1.2: Ρύθμιση του HIF-1α: **A)** σε επίπεδο μεταγραφής (π.χ. από το μονοπάτι του NF-κB), **B)** σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης από το μονοπάτι PI3K/Akt, **Γ)** οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση από τις PHD και **Δ)** σε επίπεδο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ. από τις MAPK).

1.3.1. Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α

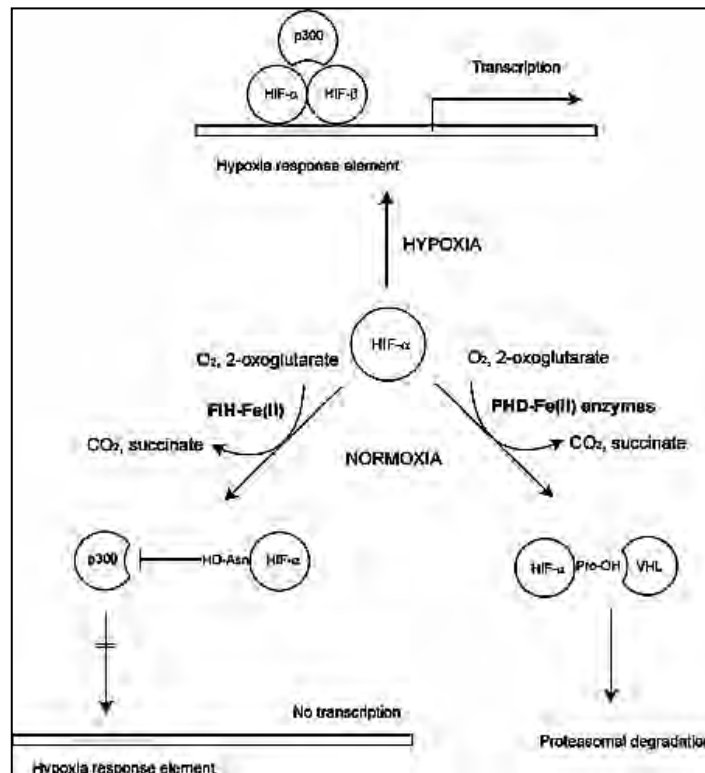
Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α παράγεται συνεχώς και καταστρέφεται, μέσω ενός μηχανισμού πολυ-ουβικτινυλίωσης, η οποία επιτελείται από τον VHL (von Hippel-Lidau), με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή του στο πτωτεάσωμα 26S [14] (Εικ. 1.2 Γ). Ο VHL είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη και υπομονάδα του συμπλόκου της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Η αλληλεπίδραση όμως του HIF-1α με τον VHL απαιτεί την υδροξυλίωση δύο καταλοίπων προλίνης της ODD περιοχής του HIF-1α, σε ένα συντηρημένο μοτίβο. Η υδροξυλίωση αυτή διαμεσολαβείται από τρεις συντηρημένες προλυλ-υδροξυλάσες (PHDs ή HPHs), οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των δι-υδρογονασών και η δράση τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, του σιδήρου, του α-κετογλουταρικού και του ασκορβικού οξέος [15].

Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου ελαττωθεί, η υδροξυλίωση παρεμποδίζεται, ο HIF-1α σταθεροποιείται και εισάγεται στον πυρήνα. Εκεί διμερίζεται με τον ARNT και επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του [3] (Εικ. 1.3). Η καθοδήγηση του HIF-1α στον πυρήνα πραγματοποιείται μέσω ειδικών αλληλουχιών που ονομάζονται σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals - NLS).



Εικόνα 1.3: Οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α από τις PHD [16].

Παρόλα αυτά, η οξυγόνο-εξαρτώμενη ρύθμιση δε βασίζεται μόνο στην καταστροφή του HIF-1α, αλλά και στον έλεγχο της ενεργότητάς του. Μια άλλη οξυγόνο-ευαίσθητη υδροξυλάση που ονομάζεται FIH (Factor Inhibiting HIF-1) τροποποιεί τον HIF-1α σε ένα κατάλοιπο ασπαραγίνης, το οποίο βρίσκεται μέσα στη C-TAD περιοχή (Asn803). Αποτέλεσμα αυτής της υδροξυλίωσης είναι η παρεμπόδιση της σύνδεσης του HIF-1α τους συμπαραγόντες της μεταγραφής CBP/p300 [17]. Η σύνδεση αυτή επιτελείται μέσω του C-TAD και μιας πλούσιας σε ιστιδίνες περιοχή των συνενεργοποιητών αυτών (Εικ. 1.4).



Εικόνα 1.4: Οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση του HIF-1α από τον παράγοντα που αναστέλλει τους HIF (FIH) [16].

Έτσι, η υδροξυλίωση αποτελεί έναν διπλό ελεγκτικό μηχανισμό ρύθμισης της δράσης του HIF-1α στη νορμοξία. Η πρωτεΐνη του HIF-1α που συντίθεται αποικοδομείται αμέσως στο πρωτεάσωμα μέσω της δράσης των PHD, κι αν κάποια μόριά του διαφύγουν αυτού του μηχανισμού καθίστανται μεταγραφικά ανενεργά λόγω της δράσης του FIH. Πτώση της συγκέντρωσης του οξυγόνου προκαλεί την απενεργοποίηση πρώτα των PHD, ενώ για την καταστολή του FIH απαιτείται μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Αυτό οφείλεται στη διαφορά των σταθερών συγγένειας των υδροξυλασών αυτών με το οξυγόνο [18].

Ο HIF-2α, λόγω της μεγάλης ομολογίας του με τον HIF-1α, υποβάλλεται σε ρύθμιση της σταθερότητας και της μεταγραφικής του ενεργότητας με τους ίδιους οξυγονο-εξαρτώμενους μηχανισμούς (PHD και FIH).

1.3.2. Ανεξάρτητη από το οξυγόνο ρύθμιση του HIF-1α

Πέρα από την επίδραση του οξυγόνου, η έκφραση και η ενεργότητα του HIF-1α ρυθμίζονται επιπλέον κι από ανεξάρτητους του οξυγόνου μηχανισμούς, οι οποίοι αποκρίνονται σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων, αναπτυξιακούς παράγοντες, κυτοκίνες

και ποικίλα στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος (π.χ. pH). Υπάρχουν πολλαπλά επίπεδα ελέγχου της ενεργότητας του HIF-1α από τα κύτταρα, από μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση έως μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [19].

1.3.2.1. Ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής

Αρχικές αναφορές για τη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου του HIF-1α, συνέδεαν το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με το μονοπάτι του HIF-1 και συγκεκριμένα έδειχναν την επίδρασή του σε επίπεδο πρωτεΐνης του HIF-1α σε απόκριση στον TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), την κολχικίνη και τον αυξητικό παράγοντα HGF (Hepatocyte Growth Factor) [20] (Εικ. 1.2 Α). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του HIF-1α αποτελεί απόκριση σε καταστάσεις φλεγμονής, καθώς ο παράγοντας IκB προκαλεί την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του HIF-1α, μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που εμπλέκει τον παράγοντα NF-κB. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση του IκB (Inhibitory κB) και η επακόλουθη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB επηρεάζουν τα βασικά επίπεδα του mRNA του HIF-1α, επάγοντας τη μεταγραφή του. Οι υπομονάδες του NF-κB, p50 και p65, αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποκινητή του γονιδίου του HIF-1α, στην περιοχή -197/-188 bp. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί απόκριση στην παρουσία θρομβίνης, H₂O₂ και την βραχείας διάρκειας υποξία [21]. Η αλληλουχία πρόσδεσης του NF-κB στον υποκινητή του HIF-1α έχει βρεθεί συντηρημένη ανάμεσα στα διάφορα είδη υποδεικνύοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης των δύο μονοπατιών.

Ο μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3 (Stat3) εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της παραγωγής του mRNA του HIF-1α, διαμεσολαβώντας στην καταστολή της μεταγραφής του HIF-1α μέσω της eIF2α κινάσης PKR [22].

1.3.2.2. Ρύθμιση σε επίπεδο πρωτεϊνικής σύνθεσης

Πέρα από την επίδραση της υποξίας στην αύξηση των επιπέδων του HIF-1α, αυτά αυξάνονται και ως απόκριση σε ερεθίσματα αυξητικών παραγόντων. Ενώ η υποξία αυξάνει τα επίπεδα του HIF-1α σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, η διέγερση από αυξητικούς παράγοντες επάγει την έκφρασή του με ιστοειδικό τρόπο. Επιπλέον, ενώ η υποξία σχετίζεται με μειωμένη αποικοδόμηση του HIF-1α, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια διεγείρουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών της κινάσης της τριφωσφορικής

ινοσιτόλης (PI3K) και των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated Protein Kinases, MAPK) [3] (Εικ. 1.2 B).

Πιο συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την PI3K και τις MAPK. Η PI3K ενεργοποιεί την κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT (επίσης γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση B, PKB) και την πρωτεΐνη mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Στο μονοπάτι των MAPK, η ERK έχει ενεργοποιηθεί από τη MEK και ενεργοποιεί με τη σειρά της την MNK. Η ERK και η mTOR φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p70 S6 κινάση (S6K), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την S6 ριβοσωμική πρωτεΐνη και την προσδεδεμένη στον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (eIF-4E) πρωτεΐνη (4E-BP1). Η πρόσδεση του 4E-BP1 στον eIF-4E εμποδίζεται από τη φωσφορυλίωσή του από την mTOR και την ERK έχοντας σαν αποτέλεσμα τη μετάφραση των mRNA με 5' κάλυμμα. Επίσης η MNK φωσφορυλιώνει τον eIF-4E και διεγείρει τη δράση του απευθείας. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η αυξημένη μετάφραση μιας ομάδας συγκεκριμένων mRNA στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο HIF-1α (Εικ. 1.2).

Έτσι η ενεργοποίηση των μονοπατιών της AKT και των MAPK, οδηγεί σε αυξημένη μετάφραση του mRNA του HIF-1 α και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α [3].

1.3.2.3. Ρύθμιση από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Μετα-μεταφραστικά ο HIF-1α ρυθμίζεται είτε μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, είτε μέσω της τροποποίησής του από έναν αριθμό διαφορετικών ενζύμων.

ο Αλληλεπιδράσεις του HIF-1α με άλλες πρωτεΐνες:

Έχει δειχθεί η ρύθμιση της σταθερότητας του HIF-1α μέσω της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες Hsp90/RACK1. Η πρωτεΐνη θερμικού σοκ Hsp90, η οποία αποτελεί μια πρωτεΐνη μοριακή συνοδό, βρέθηκε ότι συνδέεται *in vitro* με την περιοχή PAS του HIF-1α τόσο σε συνθήκες νορμοξίας αλλά και κατά την υποξία [23]. Αναστολή της Hsp90 σε συνθήκες υποξίας προκάλεσε τη μείωση της σύνδεσης του HIF-1 στο DNA αλλά και τη μεταγραφική του ενεργότητα. Επιπλέον, σε κύτταρα τα οποία δεν εξέφραζαν pVHL η αναστολή της Hsp90 προώθησε την αποικοδόμηση του HIF-1α στο πρωτεάσωμα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει αφενός ότι η Hsp90 παίζει σταθεροποιητικό ρόλο στο μόριο του HIF-1α και αφετέρου ότι η αναστολή της

αλληλεπίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του HIF-1α με ένα ανεξάρτητο του pVHL μηχανισμό [24].

Ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη RACK1 (Receptor of activated protein C kinase) βρέθηκε επίσης να αλληλεπιδρά με τον HIF-1α οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση ανεξάρτητα από τα επίπεδα οξυγόνου, την pVHL και τις PHDs. Στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι η RACK1 ανταγωνίζεται με την Hsp90 για την πρόσδεση τους στην περιοχή PAS-A στον HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, επώαση με τον αναστολέα της Hsp90 γελδαναμυκίνη οδήγησε σε πρόσδεση μόνο της RACK1 στον HIF-1α και σε επακόλουθη ουβικιτινίωση και αποικοδόμησης του. Επιπλέον η ικανότητα των αναστολέων της Hsp90 να επάγουν την αποικοδόμηση του HIF-1α εξαρτάται από την έκφραση της RACK1 [25]. Το μηχανισμό αυτό συμπληρώνει η δράση των πρωτεϊνών Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase-1 (SSAT1) και SEPT9_v1, οι οποίες επίσης αλληλεπιδρούν με τον HIF-1α και ρυθμίζουν τη σταθερότητά του μέσω της RACK1 εξαρτώμενης αποικοδόμησης του [26, 27].

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του HIF-1α με την MgcRacGap (Male germ cell Rac GTPase activator protein) φαίνεται να παίζει αρνητικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α χωρίς όμως να επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του [28]. Η πρωτεΐνη MgcRacGap ρυθμίζει τη δράση των μικρών G-πρωτεϊνών Rho που εμπλέκονται στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Έπειτα από πειράματα με το σύστημα των δύο υβριδίων, βρέθηκε ότι η MgcRacGap αλληλεπιδρά με τον HIF-1α στην περιοχή PAS-B (αμινοξέα 244-352). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι πράγματι η MgcRacGap αλληλεπιδρά με τον HIF-1α, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* σε κύτταρα θηλαστικών, επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον ARNT μειώνοντας έτσι τη μεταγραφική του ενεργότητα [29].

ο Ακετυλίωση:

Η λυσίνη 532 (K532) που εντοπίζεται στην περιοχή ODD του HIF-1α βρέθηκε να ακετυλιώνεται μέσω μιας ακετυλοτρανσφεράσης, της arrest-defective-1 (ARD1). Η ακετυλίωση της λυσίνης K532 ενισχύει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με την πρωτεΐνη VHL και οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του. Μετάλλαξη της λυσίνης 532 σε αργινίνη είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη σταθερότητα του HIF-1α [30]. Εφόσον η δράση των ακετυλοτρανσφερασών δεν επηρεάζεται από το οξυγόνο, η ARD1 είναι δραστική και ακετυλιώνει τον HIF-1α ανεξάρτητα των συνθηκών οξυγόνου που επικρατούν. Ωστόσο βρέθηκε ότι τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της ARD1

μειώνονται κατά την υποξία κρατώντας τα επίπεδα ακετυλίωσης του HIF-1α χαμηλά. Πιο πρόσφατες όμως μελέτες υποστηρίζουν πως η επίδραση της ADR1 στη σταθερότητα του HIF-1α είναι αμφίβολη [31].

- S-νιτροσυλίωση:

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) έχειδειχθεί να αυξάνει αλλά και να μειώνει τη σταθεροποίηση του HIF-1α και η δράση του φαίνεται να εξαρτάται άμεσα τόσο από τη συγκέντρωσή του όσο και από το είδος των κυττάρων [32]. Επιπλέον έχειδειχθεί πως ο HIF-1α αποτελεί στόχο νιτροζυλίωσης στην κυστεΐνη 800 της αμινοξικής αλληλουχίας του, αλλά και στην περιοχή ODD. Όσον αφορά τη νιτροζυλίωση της κυστεΐνης 800 δεν έχει σαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος της καθώς τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Ωστόσο έχει προταθεί ότι οι ουσίες-δότες του NO επάγουν τη δράση του HIF-1α αναστέλλοντας την πρόσδεση του VHL που επάγεται από την δράση της PHD2 αλλά και αναστέλλοντας τη δράση του FIH κατά τη νορμοξία [33, 34].

- Σουμοϋλίωση:

Ο HIF-1α μπορεί να σουμοϋλιώνεται, αλλά ο ρόλος αυτής της τροποποίησης παραμένει αδιευκρίνιστος. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι η σύζευξη με την SUMO προωθεί τη σταθερότητα του HIF-1α, ενώ άλλες προτείνουν ότι η αποσουμοϋλίωση του είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση και την ενεργότητα του [35-38]. Ο HIF-1α περιέχει 3 αλληλουχίες για σύνδεση της SUMO πρωτεΐνης, στις λυσίνες στις θέσεις 391, 477 και 532. Η σουμοϋλίωση του HIF-1α πιστεύεται πως γίνεται από την RanBP2 E3 λιγάση η οποία εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά των πυρηνικών πόρων [32]. Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της τροποποίησης δεν έχει διευκρινιστεί. Μια σειρά από μελέτες έδειξε ότι η σουμοϋλίωση αυξάνει τη σταθερότητα και τη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α, ενώ υπάρχουν δεδομένα που αντικρούουν αυτό τον ισχυρισμό υποστηρίζοντας ότι η σουμοϋλίωση μειώνει την ενεργότητα του HIF-1α και επάγει την ουβικιτινίωσή του μέσω του pVHL [34].

- Φωσφορυλίωση:

Η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-1α μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για να ρυθμιστεί γρήγορα και αντιστρεπτά η ενεργότητα του HIF-1, ως απόκριση σε διαφορετικά ερεθίσματα. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α μπορεί να

επάγει την ενεργότητα του, όπως αυτή η φωσφορυλίωση της Thr⁷⁹⁶ στην περιοχή C-TAD. Υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του HIF-1α στη θέση αυτή είναι η κινάση καζεΐνης 2 (CK2). Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι αναστολείς της CK2 μείωσαν τη δράση του HIF-1α [39]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι είναι η CK2 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση με τον συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής p300, αλλά παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του HIF-1α με τον FIH-1 [40].

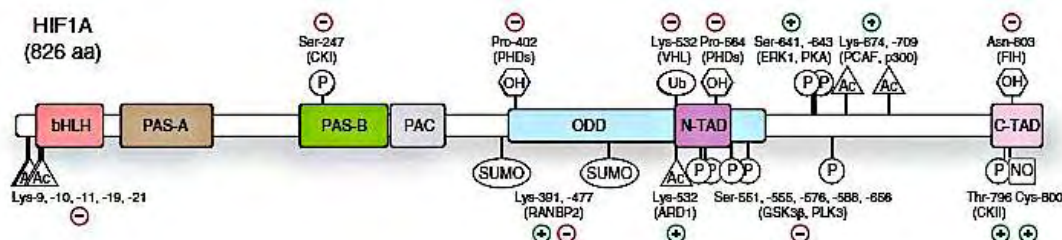
Αντίθετα, η φωσφορυλίωση από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3) σε τρία κατάλοιπα (Ser⁵⁵¹/Thr⁵⁵⁵/Ser⁵⁸⁹) μέσα στην N-TAD περιοχή του HIF-1α εντείνει την αποικοδόμησή του στο πρωτεάσωμα μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τον VHL και ρυθμίζει αρνητικά την ενεργότητα του HIF-1α [41].

Πρόσφατα έχει περιγραφεί και η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την κινάση της καζεΐνης 1 (CK1) που επίσης επηρεάζει αρνητικά την ενεργότητα του HIF-1α [42]. Η ισομορφή CK1δ φωσφορυλιώνει την Ser²⁴⁷ στην περιοχή PAS-B και δεν επηρεάζει τη σταθερότητα ή τον εντοπισμό του HIF-1α αλλά παρεμβαίνει στην ικανότητά του να σχηματίζει ενεργό σύμπλοκο με τον ARNT σε συνθήκες υποξίας. Η υπερέκφραση της CK1δ αναστέλλει την ενεργότητα του HIF-1α σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ενώ αντίθετα η αναστολή ή αποσιώπηση της CK1δ τη διεγείρει. Επιπλέον, η αναστολή της δράσης της CK1δ σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (Huh7) είχε σαν αποτέλεσμα την σημαντική αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες υποξίας, υποδεικνύοντας έτσι το ρόλο της CK1δ στην αναστολή του πολλαπλασιασμού [42].

Μια ακόμη πρόσφατη μελέτη παρουσιάζει τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από την εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 1 (CDK1) [43]. Η CDK1 ρυθμίζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του HIF-1α και τη δραστικότητα του την προώθηση ογκογένεσης. Σε συνθήκες νορμοξίας, η CDK1 φωσφορυλιώνει άμεσα τον HIF-1α στη Ser⁶⁶⁸ και αναστέλλει την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα. Έτσι η CDK1 αποτελεί μία μοριακή εξήγηση για την αύξηση των επιπέδων του HIF-1α σε πρωτογενείς και μεταστατικούς όγκους ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του οξυγόνου.

Άλλες πρόσφατες αλλά λιγότερο χαρακτηρισμένες τροποποιήσεις του HIF-1α περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση της Ser⁶⁹⁶ από την κινάση ATM και των Ser⁵⁷⁶/Ser⁶⁵⁷ από την PLK3. Και οι δύο τροποποιήσεις ενεργοποιούν τον HIF-1α σταθεροποιώντας τα πρωτεϊνικά του επίπεδα [44, 45].

Τέλος, η πλέον γνωστή και καλύτερα μελετημένη τροποποίηση είναι η απευθείας φωσφορυλίωση του HIF-1α που διαμεσολαβείται από τις ERK (p44/p42 MAPK) και θα συζητηθεί στην παράγραφο 1.4 που ακολουθεί.



Εικόνα 1.5: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α: υδροξυλιώσεις, ακετυλιώσεις, σουμυλιώσεις, νιτροξυλιώσεις και φωσφορυλιώσεις [3].

1.3.3. Μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα

Η μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1α εξαρτάται τελικά από τη συσσώρευσή του στον πυρήνα. Προκειμένου να εισέλθει στον πυρήνα ο HIF-1α χρησιμοποιεί περισσότερα από ένα μονοπάτια εισαγωγής. Το πρώτο μονοπάτι περιλαμβάνει την παρουσία ενός κλασσικού διμερούς τύπου σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Στο μόριο του HIF-1α έχουν αναγνωριστεί βάσει ομολογίας αλληλουχιών δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), ένα στην αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 17-74) και ένα στην καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 718-756). Ωστόσο έχει δειχθεί πειραματικά ότι μόνο το καρβοξυτελικό NLS είναι λειτουργικό και αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας των ιμπορτινών α και διαμεσολαβεί για τη μεταφορά του HIF-1α στον πυρήνα [46].

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου βιοχημείας της ιατρικής σχολής του Π.Θ. έδειξε ότι η ενεργός μεταφορά του HIF-1α διαμέσω των πυρηνικών πόρων μπορεί να διαμεσολαβείται και από διάφορους υποδοχείς ιμπορτινών, οπού εκτός από τα μέλη της οικογένειας των ιμπορτινών α , περιλαμβάνουν επίσης τις ιμπορτίνες 4 και 7. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις σε σημαντικά αμινοξέα του καρβοξυτελικού NLS δεν απέκλεισαν την είσοδο του HIF-1α από τον πυρήνα, υποδεικνύοντας την πιθανότητα να υπάρχει και άλλος τρόπος εισόδου του στον πυρήνα [47]. Η αλληλεπίδραση με τις ιμπορτίνες 4 και 7 περιλαμβάνει το NH₂-τελικό τμήμα του HIF-1α (αμινοξέα 1-251), το οποίο περιέχει επίσης τις bHLH και PAS-A περιοχές, αλλά η ακριβής φύση του NLS είναι ακόμα ασαφής.

Η λειτουργία περισσότερων του ενός διαφορετικών οδών, μπορούν να εξασφαλίζουν τη γρήγορη και αποτελεσματική μετατόπιση του HIF-1α στο εσωτερικό του πυρήνα, ως μέρος μιας αποτελεσματικής κυτταρικής απόκρισης σε υποξικά ερεθίσματα (Εικ. 1.6). Ωστόσο, ο χρόνος που δαπανά ο HIF-1α στο εσωτερικό του πυρήνα και, σε τελική ανάλυση, η δραστηριότητα του εξαρτάται επίσης και από τον ρυθμό πυρηνικής εξαγωγής του, η οποία εξαρτάται από την εξαπορτίνη θηλαστικών CRM1 και ρυθμίζεται από το μονοπάτι Raf/MEK/ERK (παράγραφος 1.4).

1.4. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ HIF-1α ΑΠΟ ΤΙΣ p44/42 MAPK

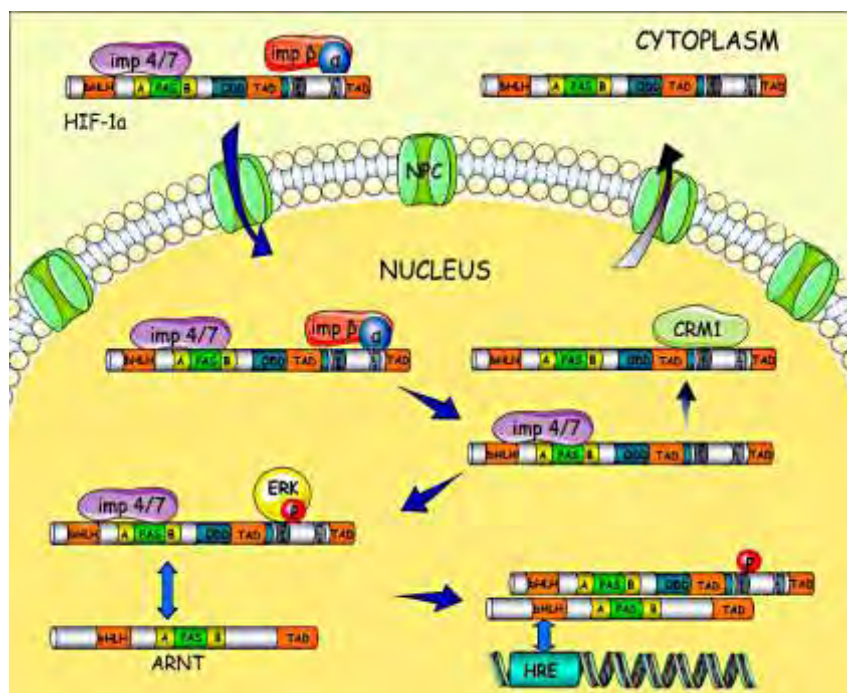
Το μονοπάτι των MAPK είναι το ένα από τα δύο γνωστότερα σηματοδοτικά μονοπάτια (το άλλο είναι το PI3K/Akt) που ρυθμίζουν την ενεργότητα του HIF-1α. Το μονοπάτι των MAPK επάγεται από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες ογκογονίδια αλλά κι από την υποξία και επηρεάζει τόσο τη μετάφραση του mRNA του HIF-1α, όσο και τη μεταγραφική του ενεργότητα. Αυτό έχει δειχθεί μετά από χρήση του αναστολέα της MEK1, PD98059, ο οποίος μειώνει την εξαρτώμενη από τον HIF-1 έκφραση των γονιδίων [48]. Επίσης διάφορες μελέτες έδειξαν ότι το μονοπάτι των ERK εμπλέκεται στην εξαρτώμενη από την υποξία λειτουργία της περιοχής ενεργοποίησης του HIF-1α [49].

Ο HIF-1α φωσφορυλιώνεται από τις ERK1/2 σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης (Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³) [49], ενώ, δεν αποτελεί στόχο των υπόλοιπων μελών της οικογένειας των MAPK (p38 ή c-JNK) [50]. Επιπλέον, αναστολή της φωσφορυλίωσης του HIF-1α είτε με μετάλλαξη των θέσεων που τροποποιούνται από τις ERK (Ser⁶⁴¹/Ser⁶⁴³ --> Ala) ή με κατεργασία με τον αναστολέα του μονοπατιού των ERK, PD89059, παρεμποδίζει τη συσσώρευση του HIF-1α στον πυρήνα, και συνεπώς, μειώνει τη μεταγραφική του ενεργότητα. Παρόλα αυτά, κατεργασία των κυττάρων που έφεραν τη μεταλλαγμένη SA μορφή του HIF-1α με Leptomycin B, έναν ειδικό αναστολέα της εξαρτώμενης από τη CRM1 εξαγωγής από τον πυρήνα, είχε ως αποτέλεσμα την συγκέντρωση της μεταλλαγμένης μορφής του HIF-1α στον πυρήνα και επανάκτηση της ενεργότητάς της. Έτσι προτάθηκε ότι η απουσία φωσφορυλίωσης από τις ERK μειώνει την πυρηνική συσσώρευση του HIF-1α λόγω της εξαγωγής του στο κυτταρόπλασμα [49]

Ο μηχανισμός λοιπόν με τον οποίο η φωσφορυλίωση από τις ERK ρυθμίζει την ενεργότητα του HIF-1α ακολουθεί τα στάδια της σύνθεσης και σταθεροποίησής του

και εμπλέκει τη ρύθμιση της μετακίνησής του μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Όμως, για να εξαχθεί ο HIF-1α από τον πυρήνα απαιτείται η παρουσία ενός σήματος εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal – NES). Έχειδειχθεί ότι επιπλέον του NLS υπάρχει κι ένα υδρόφοβο NES (⁶³²MEDIKIL⁶³⁹) τοποθετημένο πολύ κοντά στις σερίνες 641/643 που τροποποιούνται από τις ERK [1]. Αυτό το NES αλληλεπιδρά ισχυρά με τη CRM1, όταν παρεμποδίζεται η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις ERK. Αυτή η μεταφορά από και προς τον πυρήνα είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός με τον οποίο η διαμεσολαβούμενη από τις ERK φωσφορυλίωση ελέγχει την ενεργότητα του HIF-1α, καθώς η φωσφομιμητική μετάλλαξη (Ser⁶⁴¹ --> Glu) ή οι μεταλλάξεις του NES καθιστούν τον HIF-1α ανθεκτικό σε μεγάλο βαθμό στην αναστολή του μονοπατιού των MAPK. Επιπλέον και η μεταλλαγμένη μορφή του HIF-1α όπου έχουν αλλάξει τόσο το NES όσο και οι θέσεις φωσφορυλίωσης από τις ERK, ανέκτησε τις ιδιότητες της αγρίου τύπου μορφής του HIF-1α όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την ενεργότητα της [1].

Με βάση αυτά τα δεδομένα διαμορφώνεται το παρακάτω μοντέλο του ρόλου της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις ERK (Εικ. 1.6). Μετά τη σταθεροποίησή του, ο HIF-1α αλληλεπιδρά με πολλούς πυρηνικούς υποδοχείς εισαγωγής (ιμπορτίνες α/β, 4 και 7) και εισάγεται μέσα στον πυρήνα μέσω των συμπλόκων πυρηνικού πόρου (Nuclear Pore Complexes – NPCs). Όταν ο HIF-1α βρεθεί στον πυρήνα και το NES είναι εκτεθειμένο είναι δυνατό να συμβούν δύο διαφορετικά σενάρια. 1) Εάν το μονοπάτι των MAPK/ERK είναι ανενεργό, τότε η CRM1 προσδένεται στο NES και εξάγει τον HIF-1α στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας έτσι τη συγκέντρωση του στον πυρήνα και τη μεταγραφική του ενεργότητα σε χαμηλά επίπεδα. 2) Εάν οι ERK είναι ενεργές (ως αποτέλεσμα τις υποξίας ή άλλων διεγέρσεων), αυτές φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α και καλύπτουν με αυτόν τον τρόπο το NES, παγιδεύοντας τον HIF-1α στον πυρήνα ώστε να προωθείται η συσσώρευσή του εκεί και η ενεργότητά του να μεγιστοποιείται. Η επακόλουθη αλληλεπίδραση με τον ARNT έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός λειτουργικού HIF-1 ετεροδιμερούς, το οποίο συνδέεται στο DNA και διεγείρει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων με τη βοήθεια των μεταγραφικών συμπαραγόντων CPB/p300.



Εικόνα 1.6: Βιολογικός ρόλος της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις MAPK. Η φωσφορυλίωση του HIF-1α από την p42/44 MAPK αναστέλλει την αλληλεπίδρασή του με τη CRM1. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή του HIF-1α στον πυρήνα και την επακόλουθη μεταγραφή γονιδίων στόχων [19].

1.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HIF-1α ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Οι στερεοί όγκοι χαρακτηρίζονται από υποξικό μικροπεριβάλλον ως αποτέλεσμα του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε συνδυασμό με το σχηματισμό ενός αγγειακού συστήματος, το οποίο είναι δομικά και λειτουργικά ανώμαλο. Τα κύτταρα υπόκεινται σε μια ποικιλία βιολογικών αποκρίσεων όταν βρεθούν στις υποξικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και το θάνατο. Τα καρκινικά κύτταρα λοιπόν έχουν υιοθετήσει αυτά τα μονοπάτια, που επιτρέπουν στους όγκους να επιβιώσουν και ακόμα και να αυξηθούν υπό συνθήκες υποξίας [2]. Οι HIF, ως κύριοι ρυθμιστές της υποξίας, ενεργοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων που παίζουν ρόλο κλειδί σε βασικές πτυχές της βιολογίας του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της συντήρησης των βλαστικών κυττάρων, την επιβίωση των κυττάρων, τη γενετική αστάθεια, την αγγειογένεση, το μεταβολισμό της γλυκόζης, τη ρύθμιση του pH, την μείωση της δράσης του ανασοποιητικού, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητα στην ακτινοθεραπεία [2, 4].

Επομένως, και ο HIF-1 προσφέρει στα καρκινικά κύτταρα πλεονέκτημα επιβίωσης στο υποξικό τους περιβάλλον, αλλάζοντας κατά κύριο λόγο το μεταβολισμό τους και επάγοντας την δημιουργία νέων αγγείων. Πιο συγκεκριμένα, ο HIF-1 επάγει την έκφραση των μεταφορέων της γλυκόζης και σχεδόν όλων των ενζύμων της γλυκόλυσης οδηγώντας στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης. Παράλληλα, ανακαλύφθηκε ότι ο HIF-1 επηρεάζει και τη μιτοχονδριακή λειτουργία καθώς επάγει την έκφραση της κινάσης της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού, ενός ενζύμου που αναστέλλει την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού και την παραγωγή ακέτυλο-CoA, σταματώντας τον κύκλο του Krebs [51]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της κατανάλωσης οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια αλλά και της παραγωγής ROS λόγω της υποξίας. Επιπλέον, ο HIF-1 μειώνει την παραγωγή ROS επάγοντας την έκφραση μιας πιο αποδοτικής ισομορφής της οξειδάσης του κυτοχρώματος [52]. Όσον αφορά την δημιουργία νέων αγγείων, ο HIF-1 επάγει τη μεταγραφή αυξητικών παραγόντων του ενδοθηλίου όπως ο VEGF, η συνθάση του NO και άλλων παραγόντων που οδηγούν σε αγγειογένεση.

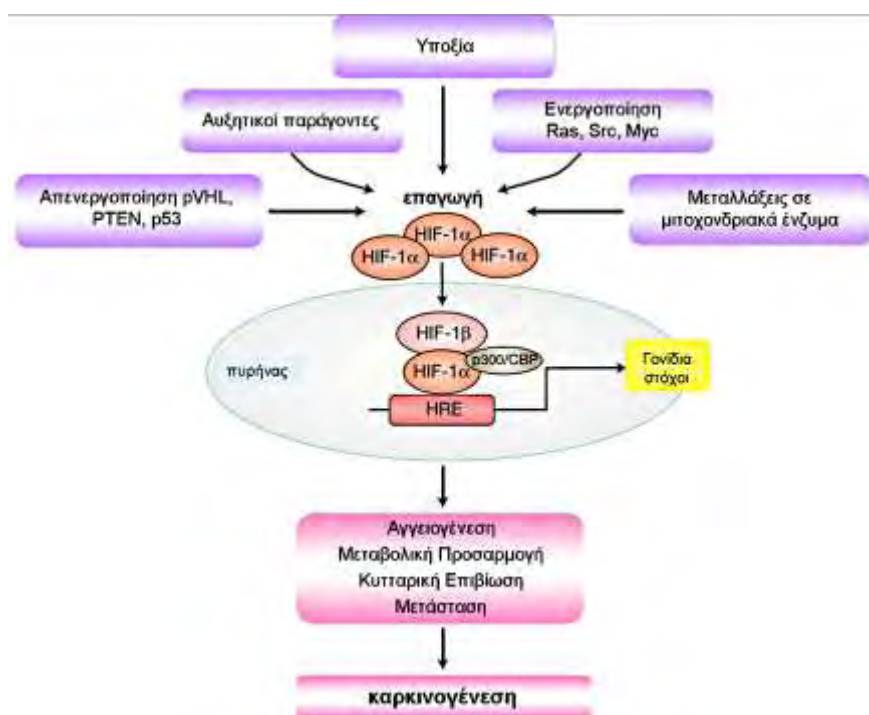
Τα αυξημένα επίπεδα του HIF-1α, αλλά και του HIF-2α σε διαγνωστικές βιοψίες όγκων είναι συνδεδεμένα με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας για τους καρκίνους της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου, του στήθους, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του παγκρεάτος, του στομάχου και του ορθού [2]. Αυτά τα αποτελέσματα συμπληρώνονται κι από πειραματικές μελέτες, οι οποίες υποστηρίζουν ότι οι γενετικοί χειρισμοί που αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανάπτυξη των όγκων, ενώ αντίθετα η απώλεια της ενεργότητας του HIF-1α έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανάπτυξης των όγκων [53].

Επίσης, οι HIF ενεργοποιούνται από γενετικές αλλαγές, κυρίως από απώλεια της λειτουργίας γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι του HIF. Για παράδειγμα, οι απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την pVHL έχει δείχθει ότι αυξάνουν την έκφραση του HIF-1α και του HIF-2α [6]. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι ο HIF-1α δεν ουβικτινιλιώνεται και δεν πρωτεολύεται. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και της φουμαράσης αναστέλλουν τη δράση των PHD με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α και επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων του όπως ο VEGF σε διάφορα είδη καρκίνων [53].

Η απορύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών επίσης συμβάλλει στην υπερέκφραση του HIF-1α και την ενεργοποίηση του HIF-1 στον καρκίνο. Σε καρκινικά κύτταρα στα οποία είναι συνεχώς ενεργά τα μονοπάτια των Ras-MAPK ή αυτό των PI3K-AKT-mTOR, έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του HIF-1α. Επιπλέον, η απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όπως του PTEN και της p53, η οποία οδηγεί σε συνεχή ενεργότητα του AKT μονοπατιού, σχετίζεται με αυξημένη ενεργότητα του HIF-1 [54].

Τα παραπάνω δεδομένα για την επαγωγή του HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα λόγω απόκρισης στην υποξία, γενετικών ανωμαλιών και δυσλειτουργίας σηματοδοτικών μονοπατιών, ενισχύονται και από ανοσοϊστοχημικά δεδομένα, σε βιοψίες ανθρώπινων όγκων όπου η έκφραση του HIF-1α βρέθηκε σημαντικά αυξημένη (Εικ. 1.7). Η υποξία και η υπερέκφραση του HIF-1α στους καρκινικούς όγκους έχει συσχετιστεί επίσης με κακή πρόγνωση, αυξημένο κίνδυνο μετάστασης και υψηλή θνησιμότητα των ασθενών με καρκίνο [7].

Πολλά στοιχεία των μονοπατιών απόκρισης στην υποξία αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους για τον καρκίνο. Έτσι λοιπόν φάρμακα που αναστέλλουν τον HIF-1 έχει δειχθεί ότι έχουν αντι-καρκινικά αποτελέσματα σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων [53].

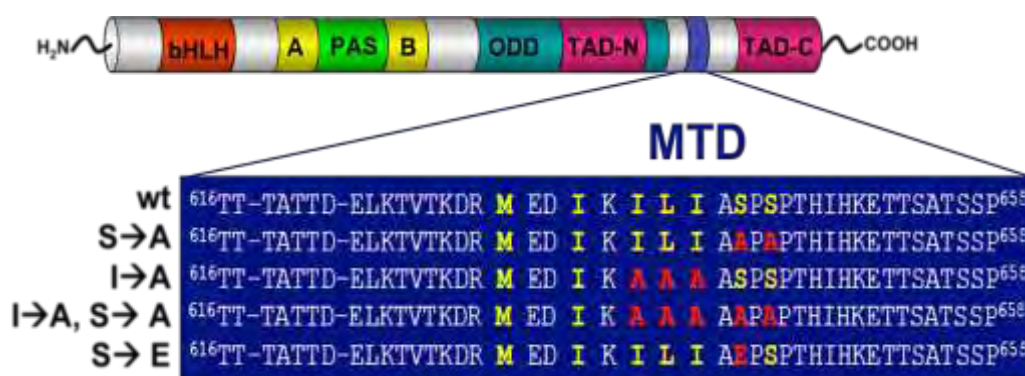


Εικόνα 1.7: Ο ρόλος του HIF-1 στην καρκινογένεση. Ο HIF-1α μπορεί να επάγεται εκτός από την υποξία και μέσω βασικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως αυτά του Ras, Src και

Myc, απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών και από μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά ένζυμα. Η υπερέκφραση του HIF-1α καταλήγει στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αγγειογένεση, τη μεταβολική προσαρμογή προσφέροντας πλεονέκτημα για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και προωθεί τη μετάσταση [54].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Μέχρι τώρα ο αγρίου τύπου HIF-1α και οι μεταλλαγμένες μορφές του SA, SE, IA και IA/SA (Εικ. 2.1) εκφράζονταν σε κύτταρα θηλαστικών με παροδική επιμόλυνση σε σύντηξη με την GFP αλληλουχία. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η κλωνοποίηση των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει ως αλληλουχία σύντηξης με τις πρωτεΐνες την αλληλουχία FLAG, η οποία είναι πολύ μικρότερη από την GFP, καθώς αποτελείται μόνο από 8 αμινοξέα (Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys), κι έτσι δεν προκαλεί μεγάλες αλλαγές στη φυσιολογική τριτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνών, όπως η GFP (25kDa). Με τις κατασκευές αυτές είναι δυνατόν να μελετήσουμε τη συμπεριφορά των διαφόρων μορφών του HIF-1α που φέρουν το οκταπεπτίδιο FLAG συντηγμένο στο αμινοτελικό τους άκρο, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Απώτερο στόχο αποτελεί η δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών που θα εκφράζουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες FLAG-HIF-1α, προκειμένου να μελετηθεί ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η επιβίωση των κυττάρων που εκφράζουν τον αγρίου τύπου HIF-1α σε σχέση με αυτά που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές του.



Εικόνα 2.1: Η περιοχή του HIF-1α στην οποία έχουν γίνει οι μεταλλάξεις (MAPK Target Domain). Η MTD περιοχή αποτελεί στόχο των MAPK για φωσφορυλίωση του HIF-1α, αλλά περιλαμβάνει και την αλληλουχία-σήμα εξόδου του HIF-1α από τον πυρήνα (κίτρινο χρώμα). Οι αντίστοιχες μεταλλάξεις στις θέσεις φωσφορυλίωσης και στο NES εμφανίζονται με κόκκινο [1].

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα TOP10 (Invitrogen). Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για κάθε εφαρμογή κλωνοποίησης. Παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη.

3.1.2. Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές:

- HeLa, ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας
- HEK293T, μεταμορφωμένα κύτταρα νεφρού από έμβρυο ανθρώπου

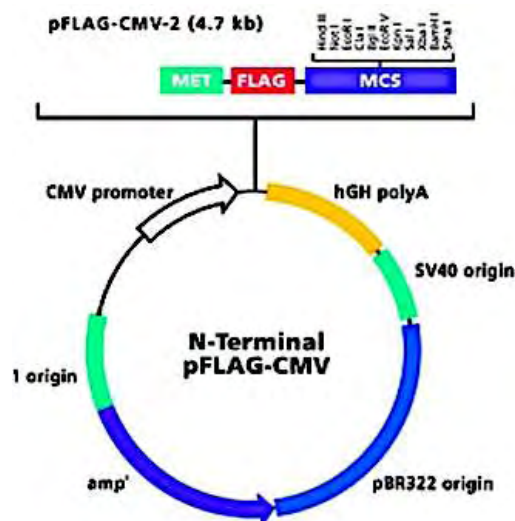
3.1.3. Θρεπτικά υγρά – Οροί – Αντιβιοτικά

Τα θρεπτικά υγρά, οι οροί και τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των ανθρώπινων κυττάρων ήταν του οίκου BIOCHROME (Biochrome, U.K.). Η προσθήκη ορού FBS και μίγματος αντιβιοτικών PS (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) γίνεται λίγο πριν από την χρήση τους.

3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς

- pCMV2-Flag

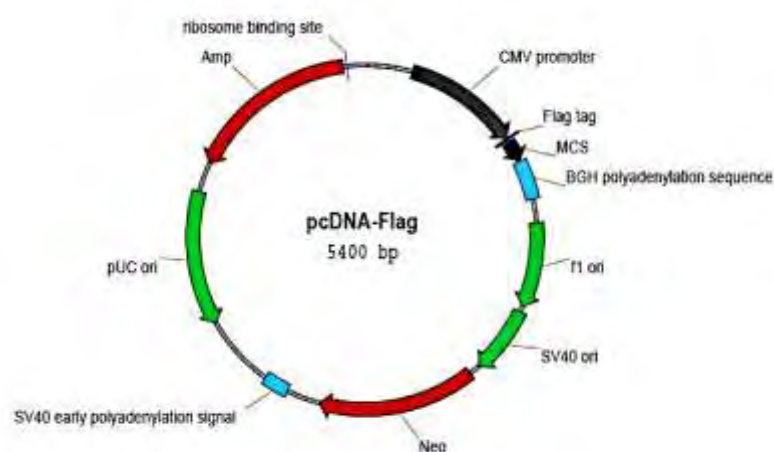
Ο πλασμιδιακός φορέας pCMV2-Flag χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης του HIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Φέρει τον υποκινητή CMV και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Περιέχει cDNA που κωδικοποιεί το οκταπεπτίδιο FLAG.



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pCMV2-Flag.

ο pcDNA3.1-FlagC

Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1 χρησιμοποιήθηκε επίσης για την έκφραση της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης του HIF-1α σε ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του ευκαρυωτικού υποκινητή CMV. Ο φορέας περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμικιλίνη, και γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη, για επιλογή σε κύτταρα θηλαστικών. Πριν τη θέση κλωνοποίησης του ξένου DNA (γονίδιο του HIF-1α) έχει τοποθετηθεί το cDNA που κωδικοποιεί το οκταπεπτίδιο FLAG.



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1-FlagC.

3.1.5. Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια των χημικών αντιδραστηρίων, αναλυτικής καθαρότητας έγινε από την εταιρία Sigma (St. Louis, USA).

3.1.6. Ένζυμα και υλικά μοριακής βιολογίας

Τα ένζυμα και τα υλικά μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών New England BioLabs Inc και Fermentas.

3.1.7. Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πολυκλωνικό αντί-HIF-1α αντίσωμα [28] από ορό κουνελιού σε αραίωση 1:1000.
- Μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την αλληλουχία FLAG Sigma (St. Louis, USA), σε αραίωση 1:15000.
- Μονοκλωνικό αντί-tubulin αντίσωμα της εταιρίας Cell Signalling σε αραίωση 1:1000.
- Συζευγμένα με υπεροξειδάση δεύτερα αντισώματα για ανοσοαποτύπωση της εταιρίας Cell Signaling, σε αραίωση 1:3000.
- Συζευγμένα με CY3 ή FITC δεύτερα αντισώματα έναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού ή ποντικού για ανοσοφθορισμό σε αραίωση 1:3000.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Παρασκευή επιδεκτικών για μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων (Competent Cells)

Η τεχνική αυτή έχει ως στόχο να επάγει την επιδεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να είναι ικανά να προσλάβουν πλασμιδιακό φορέα που περιέχει κλωνοποιημένο ένα ξένο τμήμα DNA. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι βακτήρια κατεργασμένα με διαλύματα CaCl_2 στους 4°C και με ακόλουθη θέρμανση λίγων λεπτών μπορούν να προσλάβουν DNA. Πολλές παραλλαγές της βασικής τεχνικής έχουν περιγραφεί και μία από αυτές χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Σύμφωνα μ' αυτή 5 ml θρεπτικού υλικού TYM (2% tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.1 M NaCl, 10 mM MgCl_2) εμβολιάζονται με βακτηριακά κύτταρα TOP-10, παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού (στρεπτομυκίνη). Η καλλιέργεια επωάζεται για 12-16 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση. Από αυτήν την καλλιέργεια εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού υλικού TYM ώστε τα κύτταρα να αραιώνονται 1:100. Η νέα καλλιέργεια επωάζεται για 2-3 ώρες στους 37°C υπό ανακίνηση. Κατόπιν εμβολιάζονται με 1 ml από την καλλιέργεια αυτή 50 ml θρεπτικού μέσου TYM, το οποίο δεν περιέχει αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C μέχρις ότου η οπτική της πυκνότητα φτάσει $\text{OD}_{600} = 0.35 - 0.4$. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση $4000 \times g$ για 5 λεπτά στους 4°C και αιωρούνται σε 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-I (100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 15% γλυκερόλη και 100 mM οξικού καλίου με pH 7), όπου και αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις $4000 \times g$ και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος TFB-II (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 20% γλυκερόλη με pH 7). Το αιώρημα επωάζεται σε πάγο για 1 ώρα και τέλος μοιράζεται σε κλάσματα των 100 μl . Με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στους -80°C για αρκετό χρονικό διάστημα.

3.2.2. Κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

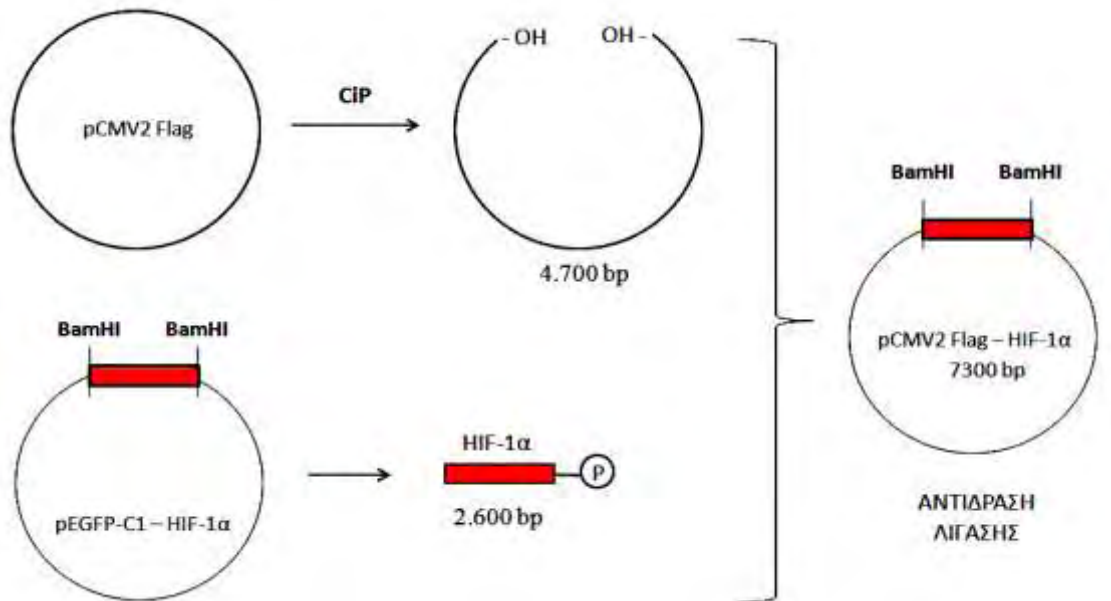
Στην παρούσα εργασία ως φορείς κλωνοποίησης χρησιμοποιούνται πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά, δίκλωνα μόρια DNA που μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια και φέρουν γονίδια που τους προσδίδουν αντίσταση σε

αντιβιοτικά. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ο pCMV2-Flag και ο pcDNA3.1-FlagC (Εικ. 3.3).

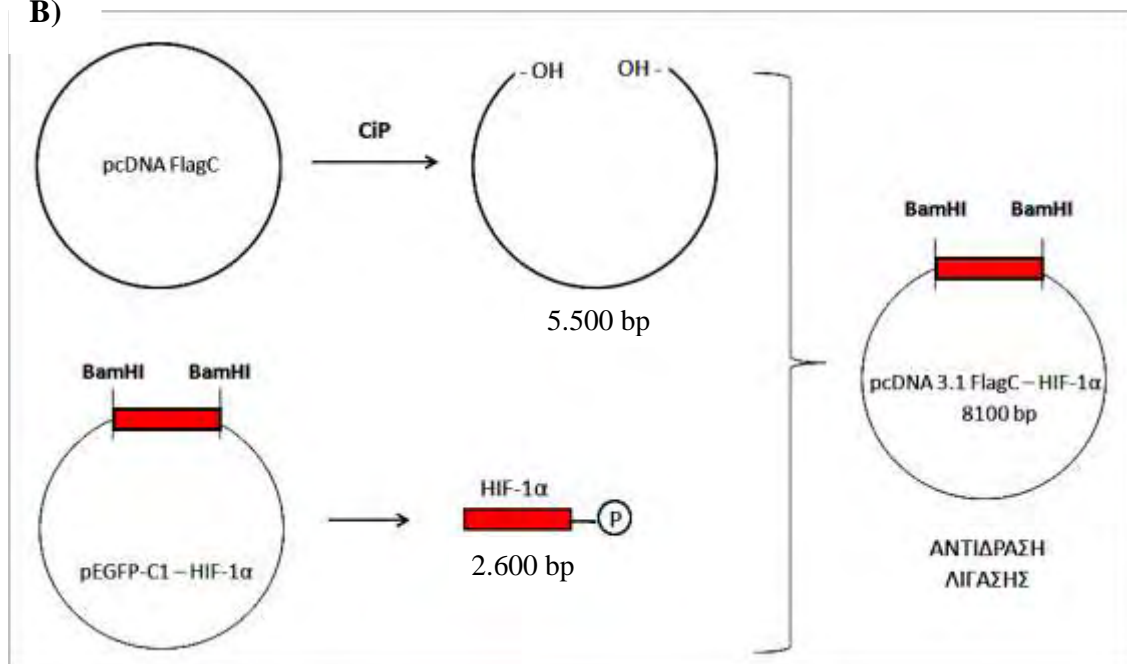
Η κλωνοποίηση DNA σε πλασμιδιακούς φορείς βασίζεται στην ικανότητα του πλασμιδιακού DNA να διασπάται σε συγκεκριμένες θέσεις μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού και να συνδέεται με το ξένο τμήμα DNA που έχει υποστεί την ίδια κατεργασία.

Το πλασμιδιακό DNA καθώς και το ξένο τμήμα DNA που έχουν κατεργαστεί με τα ίδια ένζυμα περιορισμού μπορούν να επανακυκλοποιηθούν συνδεδεμένα ομοιοπολικά στα άκρα τους με τη δημιουργία φωσφοδιεστερικού δεσμού που καταλύει μία λιγάση. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται με την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης του τμήματος DNA και του πλασμιδιακού φορέα, 1 μ l T4 DNA λιγάσης (400000 U/ml, BioLabs), 2 μ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος T4 DNA λιγάσης (500 mM Tris-Cl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 25 μ g/ml BSA pH 7.5) και απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 μ l. Το μίγμα επωάζεται για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 16°C και ακολουθεί μετασχηματισμός των κατάλληλων σε κάθε περίπτωση κυττάρων *E. coli*. Όμως το ξένο τμήμα DNA ενδέχεται να κλωνοποιηθεί με λάθος προσανατολισμό στον πλασμιδιακό φορέα, εφόσον και τα δύο άκρα είναι ίδια. Τα κύτταρα που προσλαμβάνουν το σωστό ανασυνδιασμένο πλασμίδιο μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία αντιβιοτικών, καθώς αποκτούν ανθεκτικότητα σε αυτό, επιτρέποντας την επιλογή τους σε σχέση με τα κύτταρα που δεν περιέχουν το πλασμίδιο.

A)



B)



Εικόνα 3.3: Ο πλασμιδιακός φορέας και το ξένο DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί σε αυτόν πέπτονται με το ίδιο ένζυμο περιορισμού (BamHI), ώστε να έχουν συμπληρωματικά άκρα. Ο φορέας υφίσταται κατεργασία με αλκαλική φωσφατάση, η οποία απομακρύνει τις φωσφορικές ομάδες από τα άκρα προκειμένου να μην επανακυκλοποιηθεί ο φορέας. Με αντίδραση λιγάσης επιτυγχάνεται η σύνδεση του φορέα και του DNA ενθέματος. Κλωνοποίηση του HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα **A)** pCMV2-Flag και **B)** pcDNA3.1-FlagC.

3.2.3. Ηλεκτροφόρηση και απομόνωση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους απ' αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους.

Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτής αγαρόζης με τήξη της αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Η πηκτή αποτελεί ένα πλέγμα, η πυκνότητα του οποίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς την άνοδο.

Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από ορισμένους παράγοντες.

- (1) Το μέγεθος των τμημάτων του DNA. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA στην πηκτή είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους.
- (2) Η συγκέντρωση της αγαρόζης. Ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA μετακινείται με διαφορετικές ταχύτητες σε πηκτές με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης.
- (3) Η διαμόρφωση των τμημάτων DNA. Υπερελικομένα, κυκλικά και γραμμικά τμήματα DNA ίδιου μοριακού βάρους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της πηκτής.
- (4) Το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής.
- (5) Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται πηκτές με συγκέντρωση 1% αγαρόζης, σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0.04 M Tris-οξικό, 0.001 M EDTA και pH 8.0), παρουσία και βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Έχει την ιδιότητα να απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία και να την επανεκπέμπει στο κόκκινο ορατό φάσμα, γι αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να ανιχνευθούν τα τμήματα του DNA πάνω στην πηκτή. Στο DNA προστίθεται διάλυμα φόρτωσης (5% γλυκερόλη, 0.42% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.42% κυανού του ξυλενίου) πριν να τοποθετηθεί στην πηκτή.

Για την απομόνωση των διαχωρισθέντων τμημάτων του DNA από την αγαρόζη χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και το πρωτόκολλο που παρέχονται από το Qiaquick Gel Extraction Kit της εταιρίας Qiagen. Η απομόνωση τμημάτων DNA

σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να προσροφάτε από ειδικά σφαιρίδια στήλης, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, ενώ οι προσμίξεις διέρχονται από τη στήλη.

Το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει αποκόπτεται από την πηκτή αγαρόζης και τοποθετείται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (eppendorff). Εκεί προστίθεται το διάλυμα διαλυτοποίησης QC της αγαρόζης, σε αναλογία 300 μ l/100 mg πηκτής. Ακολουθεί θέρμανση για 10 λεπτά στους 50°C με περιοδική ανάδευση ώστε να διαλυτοποιηθεί η πηκτή. Στο μίγμα προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 100 μ l/100 mg πηκτής, και μετά από καλή ανάδευση μεταφέρεται σε στήλη Qiaquick. Φυγοκεντρείται στις 13.000 \times g για 1 λεπτό, προκειμένου να συνδεθεί το DNA στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια προστίθεται στη στήλη διάλυμα πλύσης PE στο οποίο έχει προστεθεί αιθανόλη πριν τη χρήση, ώστε να απομακρυνθούν οι τυχόν προσμίξεις. Η στήλη επαναφυγοκεντρείται προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη αιθανόλης και στη συνέχεια το DNA εκλύεται με προσθήκη 30 μ l H₂O. Μικρή ποσότητα από το έκλουσμα (2-4 μ l) ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης προκειμένου να γίνει κατ' εκτίμηση ποσοτικοποίηση του DNA που απομονώθηκε.

3.2.4. Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*

Ο μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* με το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA στην παρούσα εργασία αφορά την κυτταρική σειρά TOP-10. Σε 50 μ l του αιωρήματος των επιδεκτικών βακτηρίων προστίθεται όλη η ποσότητα της αντίδρασης λιγάσης που έχει προηγηθεί και περιέχει το DNA. Τα κύτταρα αφήνονται στον πάγο για 30 λεπτά και στο τέλος αυτού του χρονικού διαστήματος υφίστανται θερμικό σοκ για 1 λεπτό στους 42°C. Κατόπιν προστίθεται θρεπτικό υλικό 500 μ l L.B. (Tryptone 1% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 1%) και ακολουθεί επώαση των βακτηρίων για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από φυγοκέντρωση 1 λεπτού στις 5000 \times g αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου και γίνεται αιώρηση του ιζήματος των κυττάρων με το υπερκείμενο που εναπομένει. Το αιώρημα των μετασχηματισμένων πλέον βακτηριακών κυττάρων απλώνεται στην επιφάνεια τριβλίου με θρεπτικό υλικό LB-άγαρ που περιέχει 100 μ g/ml αμπικιλίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής.

Τα τριβλία επωάζονται στους 37°C για 12-16 ώρες ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα που περιέχουν τους ανασυνδυασμένους, με το ξένο DNA, πλασμιδιακούς φορείς. Η επιλογή των μετασχηματισμένων

βακτηριακών κυττάρων γίνεται παρουσία της αμπικιλίνης διότι οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς περιέχουν το γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αυτό.

Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τριβλίων συλλέγονται η καθεμία χωριστά και αναπτύσσονται εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνης ώστε να απομονώσουμε το πλασμιδιακό DNA.

3.2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Βακτηριακή καλλιέργεια 3 ml LB που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής αφήνεται να αναπτυχθεί για 16 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000 x g για 2 λεπτά. Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε 50 µl διαλύματος T.E. (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA) στο οποίο έχει προστεθεί 0.1 mg/ml RNase A. Στη συνέχεια προστίθενται 100 µl διαλύματος λύσης των κυττάρων (0.2 M NaOH, 1% SDS) και πραγματοποιείται απαλή ανάδευση ώστε να καταστεί ομογενές. Μετά από διάστημα 3 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 150 µl διαλύματος εξουδετέρωσης (3 M οξικό νάτριο pH 5.1) με σκοπό την εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης και τον χονδρικό διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό και τις βακτηριακές πρωτεΐνες. Μετά από απαλή ανακίνηση ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14.000 x g. Στο πλασμιδιακό DNA το οποίο έχει διαχωριστεί στο υπερκείμενο, προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία κατ' όγκο 1:0.7 και μετά από καλή ανάδευση, αφήνεται για 20 λεπτά στους -20°C. Η ισοπροπανόλη κατακρημνίζει το DNA, το οποίο παραλαμβάνεται σαν ίζημα μετά από φυγοκέντρηση στις 14.000 x g για 10 λεπτά, και επαναιωρείται σε 30 µl H₂O.

3.2.6. Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας

Η απομόνωση και ο καθαρισμός πλασμιδιακού DNA έγινε χρησιμοποιώντας το kit NucleoBond Xtra midi της Qiagen.

Βακτηριακή καλλιέργεια 50 ml LB που περιέχει αμπικιλίνη αφήνεται να αναπτυχθεί για 16 ώρες στους 37°C και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 5000 x g για 15 λεπτά. Το ίζημα που απομένει μετά από την απόχυση του υπερκειμένου αιωρείται σε 8 ml διαλύματος επαναιώρησης (RES + RNase A). Στη συνέχεια τα κύτταρα λύνονται με προσθήκη 8 ml διαλύματος λύσης (LYS), το οποίο περιέχει SDS και NaOH, με απαλή ανάδευση ώστε να καταστεί ομογενές. Μετά από διάστημα 5 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται 8 ml διαλύματος

εξουδετέρωσης (NEU), προκειμένου να πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης με οξικό κάλιο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 30 λεπτά στις 10000 x g ενώ συγχρόνως γίνεται και η εξισορρόπηση της στήλης με 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης (EQU). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αφού απομακρυνθεί με προσοχή από το σωλήνα φυγοκέντρησης ώστε να μην παραληφθεί συγχρόνως το κολλώδες ίζημα, διαβιβάζεται από τη στήλη. Μετά τη διέλευση του υπερκειμένου από τη στήλη, γίνεται πλύση της στήλης δύο φορές, αρχικά με 8 ml διαλύματος EQU κι έπειτα με 8 ml διαλύματος πλύσης (WASH), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις από την προηγούμενη κατεργασία. Η έκλυση του πλασμιδιακού DNA γίνεται με τη διέλευση 5 ml διαλύματος έκλυσης (ELU). Αφού συλλεχθεί το σύνολο του παραπάνω διαλύματος γίνεται κατακρήμνιση του DNA προσθέτοντας 0.7 όγκους ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 30 λεπτά. Μετά από προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου γίνεται μια σύντομη πλύση με 2 ml 70% αιθανόλη και το ίζημα που παραλαμβάνεται μετά από νέα φυγοκέντρηση στις 10000 x g για 10 λεπτά, διαλύεται σε H₂O. Η περιεκτικότητα του διαλύματος σε DNA προσδιορίζεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm.

3.2.7. Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

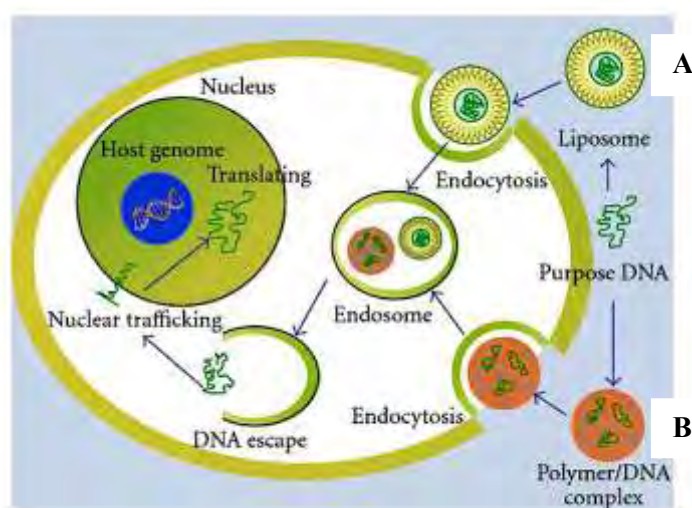
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού (HEK293T). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) της εταιρείας Gibco-Invitrogen (Life Technologies Inc., U.S.A.), στο οποίο προστίθενται αντιβιοτικά, 100U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη, και 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και σε τριβλία διαμέτρου 10 cm. Επωάζονται σε υγραινόμενο θάλαμο επώασης στους 37°C και 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής, ώστε να μειώνεται ο κίνδυνος επιμολύνσεων.

Η καλλιέργεια ανανεώνεται κάθε 48 ώρες, όπου τα κύτταρα καταλαμβάνουν περισσότερο από το 80% της επιφάνειας του τριβλίου. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από την επιφάνεια του τριβλίου, όπου βρίσκονται προσκολλημένα τα κύτταρα. Έπειτα τα κύτταρα ξεπλένονται με αποστειρωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων 1× PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.46 mM KH₂PO₄) και αποκολλώνται από το υπόστρωμα με επίδραση με το ένζυμο θρυψίνη για λίγα λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, ώστε να

αραιωθούν τα κύτταρα επαρκώς για την έναρξη νέας καλλιέργειας, και γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων. Ποσότητα 1ml του αιωρήματος των κυττάρων μεταφέρονται σε νέα τριβλία στα οποία προστίθενται 7 ml θρεπτικού μέσου.

3.2.8. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών και την έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων ως πρωτεΐνες σύντηξης με χαρακτηριστικές αλληλουχίες που είναι εύκολα ανιχνεύσιμες (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4: Παροδική επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών με πλασμιδιακό DNA με **A)** λιποσωμικής φύσης ενώσεις και **B)** κατιονικής φύσης ενώσεις. Ανατύπωση από: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3010860_CDI2010-565643.001&req=4

Στην παρούσα εργασία, η παροδική επιμόλυνση κυττάρων βασίζεται στην αργή μίξη του πλασμιδιακού DNA με κατιονικής φύσης παράγοντες επιμόλυνσης. Οι θετικά ενώσεις σχηματίζουν πολυμερή σύμπλοκα με τις αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες του νουκλεϊκού οξέος. Έτσι σε υδατικό περιβάλλον επιτυγχάνεται η δημιουργία συμπλόκων με θετικά φορτισμένη επιφάνεια. Το θετικό φορτίο της επιφάνειας των πολυμερών μεσολαβεί επίσης στην αλληλεπίδραση του νουκλεϊκού οξέος και της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας την ενδοκύτωση του συμπλόκου με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη κυττάρου (Εικ. 3.4 B).

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές του pH (βέλτιστο pH 6.9-7.2) καθώς και στην καθαρότητα του DNA (τα εμπορικά kit καθαρισμού DNA δίνουν

DNA επαρκούς καθαρότητας για την εφαρμογή της μεθόδου). Τα χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι η εντόπιση του κλωνοποιημένου πλασμιδιακού φορέα εκτός του γενώματος των κυττάρων, καθώς και η ανίχνευση και παραμονή του προϊόντος του κλωνοποιημένου γονιδίου για χρονικό διάστημα 1-4 ημερών. Επίσης σε κάθε κυτταρική διαίρεση μόνο τα μισά από τα θυγατρικά κύτταρα είναι φορείς του πλασμιδιακού DNA που εισάχθηκε κατά την επιμόλυνση.

Τα ανθρώπινα κύτταρα HeLa και HEK293T, επιμολύνονται παροδικά με τα γονίδια του HIF-1α και των μεταλλαγμένων του μορφών, κλωνοποιημένα στους πλασμιδιακούς φορείς pCMV2-Flag και pcDNA3.1-FlagC. Η καλλιέργεια των κυττάρων πριν την επιμόλυνση πρέπει να καταλαμβάνει το 50-60% της επιφάνειας του τριβλίου. Το μίγμα του DNA με τον παράγοντα διαμόλυνσης Turbofect ή PEI σε αναλογία 1:2 προστίθεται στάγδην σε θρεπτικό μέσο DMEM το οποίο δεν περιέχει FBS. Το μίγμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται για 8-15 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η δημιουργία συμπλόκων του DNA με τον παράγοντα διαμόλυνσης. Ακολούθως απομακρύνεται το θρεπτικό υγρό από τα κύτταρα, αυτά ξεπλένονται 1 φορά με PBS 1× και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, το οποίο είναι είτε πλήρες (περιέχει FBS) είτε περιέχει τη μισή ποσότητα ορού, ανάλογα με τον παράγοντα διαμόλυνσης που χρησιμοποιείται. Στη συνέχεια προστίθεται το αιώρημα DNA-παράγοντα διαμόλυνσης στάγδην στο τριβλίο της καλλιέργειας. Τα κύτταρα επωάζονται για 2-4 ώρες και κατόπιν το θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα διαμόλυνσης αφαιρείται, τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS 1× και προστίθεται σε αυτά η κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επωάζονται για 24-48 ώρες πριν ελεγχθεί η έκφραση της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το πλασμίδιο.

3.2.9. Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση κι ανοσοαποτύπωση κατά Western

3.2.9.1. Λύση των κυττάρων και παρασκευή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Τα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί ο HIF-1α, αρχικά ξεπλένονται με 1× PBS και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά διάλυμα λύσης (Lysis buffer), προκειμένου να γίνει ρήξη των μεμβρανών και να παραληφθεί το διαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα.

Lysis Buffer : 25mM Tris pH 7.5
 150 mM NaCl

2 mM MgCl₂
1% Triton X-100
5 mM DTT
1 mM PMSF

Έπειτα αποκολλώνται από το τριβλίο με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας και το εκχύλισμα συλλέγεται και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10.000 rpm για 10 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν οι κυτταρικές μεμβράνες. Μέρος του υπερκείμενου χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του εκχυλίσματος με τη μέθοδο Bradford (παράγραφος 3.2.9.2), ενώ στο υπόλοιπο υπερκείμενο προστίθεται DTT και διάλυμα Laemmli (διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων) σε αναλογία 1:4.

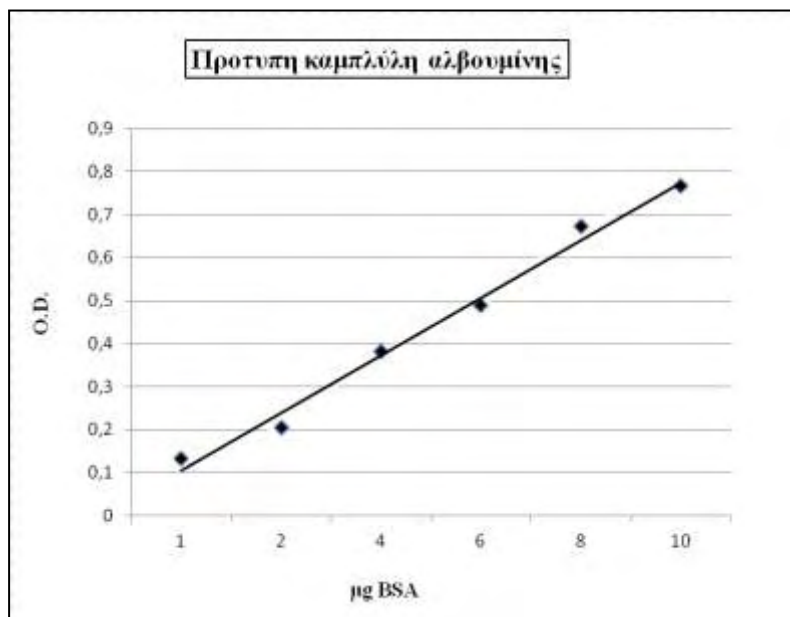
Laemmli Buffer : 250 mM Tris pH 6.8
9.2% SDS
40% γλυκερόλη
0.2% κυανό της βρωμοφαινόλης
100 mM DTT

Τα δείγματα θερμαίνονται στους 97°C για 5 λεπτά κι αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι την ημέρα της ηλεκτροφόρησης.

3.2.9.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής σε όξινο περιβάλλον, τη μεταβολή του μεγίστου απορρόφησης μετά τη συμπλοκοποίηση (από τα 465 nm στα 595 nm) και τη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου αυτού.

Το αντιδραστήριο αποτελείται από τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 που προστίθεται σε συγκέντρωση 1 mg/ml, σε 200 ml διαλύματος φωσφορικού οξέως 85% υπό ανάδευση και το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται με νερό στο 1 lt. Μετά την ανάμιξη του πρωτεϊνικού δείγματος και του αντιδραστηρίου, το σχηματιζόμενο σύμπλοκο απορροφά στα 595 nm. Η απορρόφηση αυτή ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη αναφοράς με αλβουμίνη (BSA), έτσι ώστε προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.



μg BSA	O.D. 595
1	0,132
2	0,204
4	0,382
6	0,488
8	0,672
10	0,766

$$y = 0,0719x + 0,0694$$

$$R^2 = 0,993$$

Εικόνα 3.6: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

3.2.9.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης των φορτισμένων μορίων διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, κι έτσι προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για το διαχωρισμό μακρομορίων. Η ταχύτητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα εξαρτάται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης σύμφωνα με την εξίσωση:

$$v = E * q / f$$

όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες του πηκτώματος μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σε πήκτωμα, που λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός. Το πήκτωμα ακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές

αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου και σχηματίζεται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενοδισακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$) που συνδέει τις αλυσίδες του πρώτου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους που το μέγεθος τους εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού ανάλογα και με τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών με την προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) για την έναρξη του μηχανισμού και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) για τη διάδοση του.

Στην παρούσα εργασία η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται είναι ασυνεχής. Το σύστημα που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού, που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες κατά την κίνηση τους μέσα σ' αυτό, ύψους 7.5 cm και πάχους 1 mm και το πήκτωμα επιστοίβαξης, που είναι υπεύθυνο για τη συμπίκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα. Οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση 2.5 cm μέσα στο πήκτωμα επιστοίβαξης πριν εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Οι θέσεις εισαγωγής του δείγματος δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος επιστοίβαξης.

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του συστήματος για ένα πήκτωμα είναι οι εξής:

Πήκτωμα επιστοίβαξης:

0.45 ml ακρυλαμίδιο

1 ml διάλυμα επιστοίβαξης

2.5 ml H_2O

και για τον πολυμερισμό του πηκτώματος:

25 μl APS

25 μl TEMED

Διάλυμα επιστοίβαξης:

0.125 M Tris-HCl pH 6.8

2 mM EDTA

0.1% SDS

Πήκτωμα διαχωρισμού 10% :

1.25 ml ακρυλαμίδιο

1.25 ml διάλυμα διαχωρισμού
2.5 ml H₂O
και για τον πολυμερισμό του πηκτώματος:
20 µl APS
10 µl TEMED

Διάλυμα διαχωρισμού:

0.375 M Tris-HCl pH 8.8
2 mM EDTA
0.1 % SDS

Στην ηλεκτροφόρηση αυτή χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκακυλοθειικό νάτριο (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών, ανεξάρτητα της ιονικής ισχύος, σε εντελώς καθορισμένα ποσά κατά βάρος (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι μοναδική συνάρτηση του μοριακού βάρους. Έτσι οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται γρηγορότερα, ενώ οι μεγάλες πρωτεΐνες παραμένουν πιο κοντά στο σημείο εκκίνησης (Εικ. 3.6).

Το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το πήκτωμα διαχωρισμού. Επιπλέον το πήκτωμα επιστοίβαξης έχει pH 6.8 με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες του δείγματος να παγιδούνται ανάμεσα σε Cl⁻ και μόρια γλυκίνης του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Τα Cl⁻ έχουν υψηλή κινητικότητα και προηγούνται των πρωτεϊνών ενώ τα μόρια γλυκίνης έχουν χαμηλή κινητικότητα και ακολουθούν τις πρωτεΐνες. Παρόλο που τα Cl⁻ προηγούνται από τις πρωτεΐνες δεν μπορούν να απομακρυνθούν, διότι οι τελευταίες φέρουν θετικό φορτίο κι έτσι δημιουργείται μεταξύ τους μια διαφορά δυναμικού η οποία τα κρατάει σε κοντινή απόσταση. Έτσι στο τέλος του πηκτώματος επιστοίβαξης δημιουργείται μια ζώνη στην οποία βρίσκονται όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος ανεξαρτήτου μεγέθους, με αποτέλεσμα να εισέρχονται όλες ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Με λίγα λόγια, η κινητικότητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα επιστοίβαξης εξαρτάται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο κι όχι από το

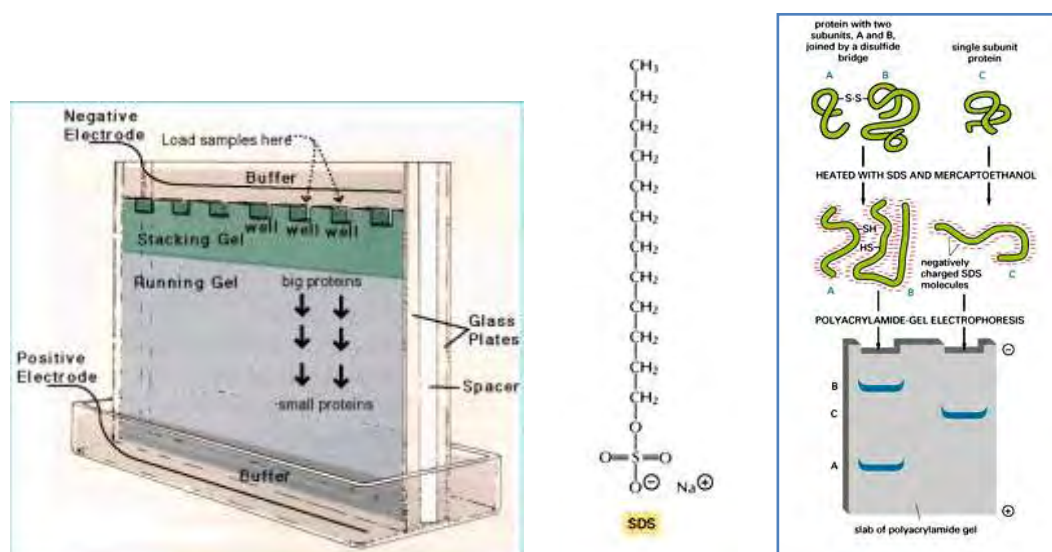
μοριακό τους βάρος. Το πήκτωμα διαχωρισμού που ακολουθεί όμως έχει διαφορετικό pH 8.8 και μικρότερους πόρους. Σε αυτό το περιβάλλον η κινητικότητα των πρωτεϊνών μειώνεται ενώ των μορίων γλυκίνης αυξάνεται καθώς ιοντίζονται και προσπερνούν τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με βάση το μέγεθός τους.

Όλη η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer):

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

0.25 M Tris
1.92 M γλυκίνη
0.5% SDS

Τα δείγματα, πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοιβαξης, έχουν διαλυθεί στο διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων (Laemmli buffer), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 97°C, ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, 50 µg δείγματος φορτώνονται στις θέσεις εισαγωγής δείγματος της πηκτής επιστοιβαξης, καθώς επίσης και μάρτυρας αποτελούμενος από πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 100 V έως τη στιγμή που ο δείκτης εξέρχεται από την πηκτή.



Εικόνα 3.6: Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE. Ανατύπωση από: Berg J. M., Tymoczko J. L. & L. Stryer: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ Τόμος I & II Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

3.2.9.4. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται στην πορεία σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, από την πηκτή προς τη μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και στον εγκλωβισμό τους στο πλέγμα της μεμβράνης.

Η μεταφορά επιτυγχάνεται μέσα σε σχεδόν υγρό περιβάλλον με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer). Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνται διαδοχικά 2 χαρτιά Whatman 3MM, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και τέλος άλλα 2 χαρτιά Whatman 3MM. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και τοποθετούνται με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό (Εικ. 3.7 B).

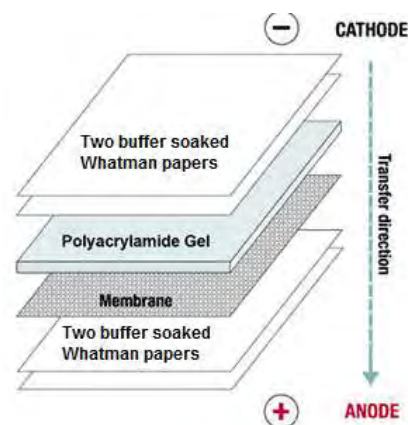
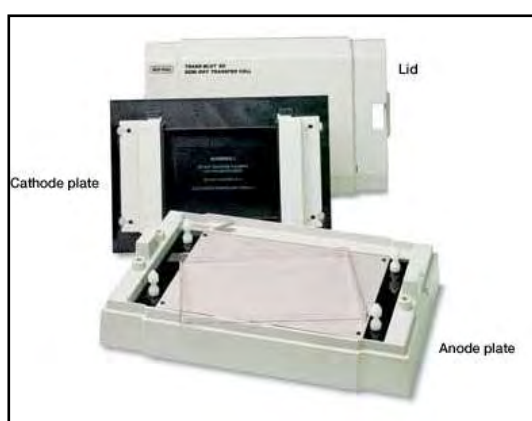
Transfer Buffer : 125 mM Tris-Borate (pH 8.5)
0.2% SDS
0.5 mM DTT

Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε συνθήκες 10 V για 75 λεπτά. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μοντέλο TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell της εταιρίας BIO-RAD (Εικ. 3.7 A).

Στο τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική Ponceau S., προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Εφόσον σημειωθούν οι ζώνες του μάρτυρα, η μεμβράνη αποχρωματίζεται με απεσταγμένο νερό και διάλυμα 1× PBS – 0.1% Tween20.

A

B



Εικόνα 3.7: Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε σχεδόν υγρό περιβάλλον (Semi-Dry Transfer), **A)** Απεικόνιση της συσκευής TRANS-BLOT και **B)** Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ανατύπωση από: www.bio-rad.com

3.2.9.5. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που καθιστά δυνατό τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Ένα αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά την καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο και η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος, το οποίο εκτός ότι είναι ικανό να αναγνωρίσει και να δεσμευθεί με τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού αντισώματος, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο κάποιο ένζυμο-δείκτη, όπως υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση, το οποίο αντιδρώντας με ένα εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση καταδεικνύοντας έτσι τη ζώνη του αντιγόνου.

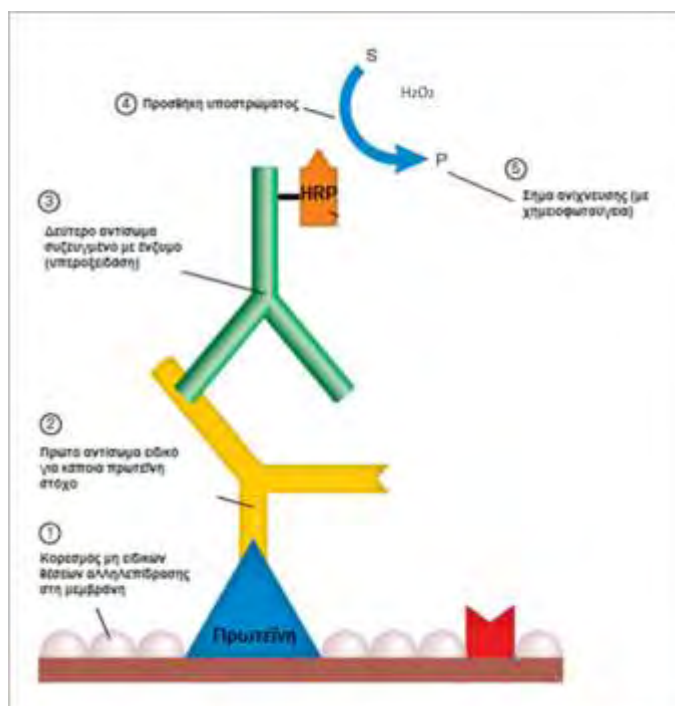
Στη συγκεκριμένη εργασία, η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση του HIF-1α σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag σε εκχυλίσματα κυττάρων HEK293T.

Για το σκοπό αυτό η ανίχνευση του HIF-1α στα διάφορα πρωτεϊνικά παρασκευάσματα έγινε με πολυκλωνικό αντίσωμα που έχει απομονωθεί από αντιγόρο κουνελιού, το οποίο είχε ανοσοποιηθεί με το τμήμα 348-826 της αμινοξικής ακολουθίας του HIF-1α, σε αραίωση 1:1000 [28]. Το δεύτερο αντίσωμα απέναντι στις ανοσοσφαιρίνες IgG κουνελιού είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση και προέρχεται από την εταιρία Cell Signalling, σε αραίωση 1:3000.

Επίσης στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα παροδικά επιμολυσμένων κυττάρων με πρωτεΐνες σύντηξης που περιέχουν την ακολουθία FLAG, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την αμινοξική

ακολουθία Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (FLAG), σε αραίωση 1:15000 και ανιχνεύεται με τη χημιοφωταύγεια (αντίδραση υπεροξειδάσης, HRP) του δευτέρου αντισώματος το οποίο δεσμεύεται στις ανοσοσφαιρίνες IgG ποντικού.

Η διαδικασία που εφαρμόζεται, είναι κοινή σε όλες τις περιπτώσεις. Αρχικά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, εμβαπτίζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού που αποτελείται από 5% αποβουτυρωμένο γάλα σκόνη σε διάλυμα $1\times$ PBS - 0.1% Tween20, ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφύγουμε τις μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Κατόπιν η μεμβράνη επωάζεται με το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα που έχει αραιωθεί κατάλληλα σε διάλυμα κορεσμού, υπό συνεχή ανακίνηση για 16 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 λεπτών της μεμβράνης με διάλυμα $1\times$ PBS – 0.1% Tween20 και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το δεύτερο αντίσωμα σε διάλυμα κορεσμού. Αφού η μεμβράνη υποστεί 3 πλύσεις των 10 λεπτών με $1\times$ PBS – 0.1% Tween20, εκτελείται η ανίχνευση των πρωτεϊνών, με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας. Η χρωμοαντίδραση επιτυγχάνεται με την προσθήκη 30 μ l H_2O_2 και 100 μ l κουμαρικού οξέος (6.8 mM κουμαρικού οξέος σε DMSO) σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1.25 mM λουμινόλης σε Tris-Cl pH 8.5) για 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη χημιοφωταύγεια εκλύεται φως ως αποτέλεσμα της χημικής αντίδρασης, κατά την οποία η υπεροξειδάση καταλύει σε αλκαλικό περιβάλλον την οξείδωση της λουμινόλης κάτω από την επίδραση του H_2O_2 με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων (Εικ. 3.8).



Εικόνα 3.8: Ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης στόχου με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

3.2.10. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών και στη συγκεκριμένη μελέτη σε ανθρώπινα HeLa κύτταρα. Ο ανοσοφθορισμός βασίζεται στην αλληλεπίδραση των κατάλληλων αντισωμάτων με τα αντίστοιχα αντιγόνα τους που βρίσκονται στις διάφορες υποκυτταρικές περιοχές των κυττάρων. Περαιτέρω επεξεργασία με δεύτερα αντισώματα, τα οποία φέρουν συζευγμένες φθορίζουσες ομάδες επιτρέπει τον εντοπισμό των πρωτεϊνών στα κύτταρα. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται με την επίδραση φωτός κατάλληλου μήκους κύματος, το οποίο προσπίπτει κάθετα στο επίπεδο των δειγμάτων. Η παρατήρηση γίνεται με τη χρήση μικροσκοπίου το οποίο φέρει κατάλληλους φακούς και φίλτρα απορρόφησης του φωτός.

Αναλυτικότερα η διαδικασία που ακολουθείται στην παρούσα εργασία είναι η εξής. Τα κύτταρα αρχικά αφήνονται να αναπτυχθούν για 24 ώρες και να προσκολληθούν πάνω σε καλυπτρίδες. Κατόπιν υφίστανται παροδική επιμόλυνση με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφος 3.2.8) και στη συνέχεια αφήνονται άλλες 24 ώρες να αναπτυχθούν. Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και στερεώνονται με διάλυμα φορμαλδεΰδης 3% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με διάλυμα 1× PBS – 0.1% Tween20, για 5 λεπτά και έπειτα τα κύτταρα καθίστανται διαπερατά με διάλυμα PBS, 1% Triton X-

100 για 15 λεπτά στους 4°C. Τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές με διάλυμα 1× PBS – 0.1% Tween20 για 5 λεπτά και κατόπιν μπλοκάρονται οι μη ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης με το αντίσωμα με 1% BSA σε 1× PBS – 0.1% Tween20 για 1 ώρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με τα πρώτα αντισώματα έναντι των HIF-1α και FLAG, σε αραιώση 1:1000 και 1:15000 αντίστοιχα, για 16 ώρες στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, μετά από τρεις πλύσεις των 5 λεπτών με 1× PBS – 0.1% Tween20 ακολουθεί επώαση με τα δεύτερα αντισώματα που αναγνωρίζουν ανοσοσφαιρίνες κουνελιού ή ποντικού και φέρουν φθορίζουσες ομάδες Cy3 (εκπομπή στα 564 nm) ή FITC (εκπομπή στα 488 nm) αντίστοιχα. Τα αντισώματα αραιώνονται στα 1:500 και γίνεται επώαση για 1 ώρα. Τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές με διάλυμα 1× PBS – 0.1% Tween20 για 5 λεπτά.

Κατόπιν οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα διατήρησης φθορισμού MOWIOL (Sigma) που περιέχει τη χρωστική ουσία DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) η οποία δεσμεύεται στη χρωματίνη κι έτσι γίνεται χρώση του πυρήνα των κυττάρων. Τέλος γίνεται παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο και λήψη των φωτογραφιών.

3.2.11. Μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας

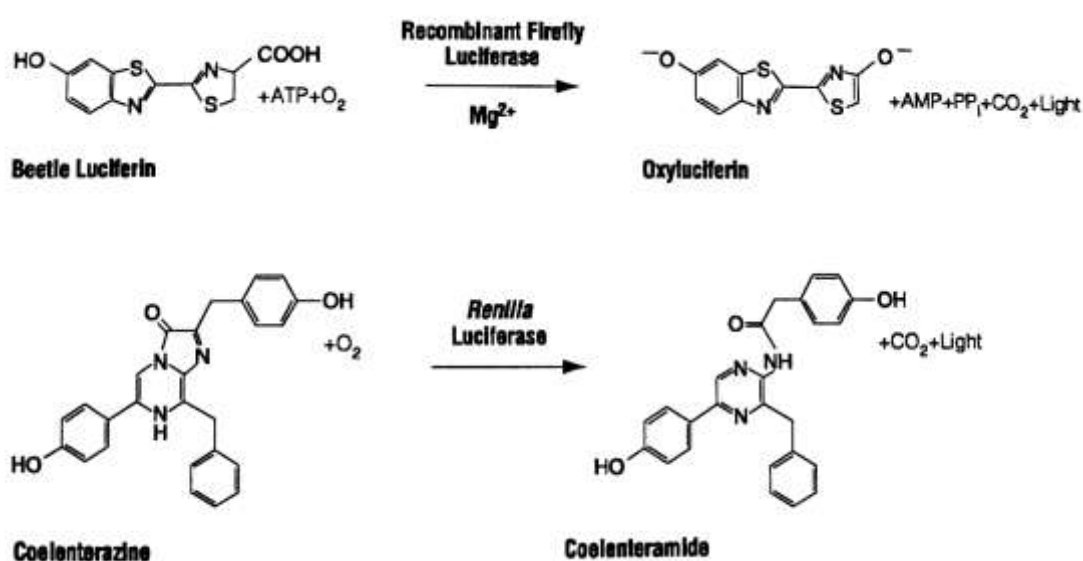
Στην παρούσα εργασία έγινε μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών του HIF-1α με φωταύγεια, χρησιμοποιώντας το kit Dual-Luciferase Reporter Assay System της εταιρείας Promega.

Χρησιμοποιήθηκε το οξειδωτικό ένζυμο λουσιφεράση δύο διαφορετικών οργανισμών, της πυγολαμπίδας (Firefly luciferase) και του θαλάσσιου οργανισμού *Renilla reniformis* (*Renilla* luciferase). Οι λουσιφεράσες αυτές, εξαιτίας της διαφορετικής εξελικτικής τους προέλευσης, έχουν ανάλογα ενζυμική δομή και απαιτήσεις υποστρώματος. Αυτές οι διαφορές καθιστούν δυνατή την επιλεκτική διάκριση μεταξύ των αντίστοιχων αντιδράσεων βιοφωταύγειας του καθενός ενζύμου.

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας λειτουργεί ως γενετική αναφορά της επαγόμενης από τον HIF μεταγραφής. Διότι το πλασμίδιο που φέρει το cDNA της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας έχει στον υποκινητή του HREs, στα οποία προσδένεται ο HIF-1α προκειμένου να επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς. Έτσι η ενεργότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας είναι το μέτρο της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1. Η εκπομπή φωτονίων επιτυγχάνεται μέσω οξείδωσης της λουσιφερίνης της πυγολαμπίδας σε μία αντίδραση που απαιτεί ATP,

Mg⁺² και O₂. Υπό φυσιολογικές συνθήκες αντίδρασης, η οξείδωση λαμβάνει χώρα μέσω ενός λουσιφερίλ-AMP ενδιάμεσου που καταστρέφεται πολύ αργά. Ως αποτέλεσμα, από τη στιγμή που το υπόστρωμα και το ένζυμο αναμιγνύονται παράγεται πολύ γρήγορα φως (Εικ. 3.9).

Η *Renilla* λουσιφεράση που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη απαιτεί O₂ για την αντίδραση φωταύγειας. Είναι κλωνοποιημένη σε πλασμίδιο το οποίο φέρει υποκινητή που επάγεται από τον γενικό μεταγραφικό μηχανισμό και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της διαδικασίας επιμόλυνσης και επομένως για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (Εικ. 3.9).



Εικόνα 3.9: Αντίδραση φωταύγειας που καταλύεται από τις Firefly και *Renilla* λουσιφεράσης. Ανατύπωση από: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol/>

Το συγκεκριμένο kit, για την ποσοτικοποίηση της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας χρησιμοποιούνται συνένζυμα, ώστε παρέχουν καλύτερη συνολική κινητική της αντίδρασης. Παρουσία του CoA, η αντίδραση της λουσιφεράσης αποδίδει σταθεροποιημένα σήματα φωταύγειας με σημαντικά μεγαλύτερες εντάσεις σε σχέση με εκείνα που λαμβάνονται από τη συμβατική χημική αντίδραση. Η διαδικασία είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και εκτείνεται σε μία γραμμική περιοχή που καλύπτει τουλάχιστον επτά τάξεις μεγέθους σε συγκέντρωση ενζύμου.

Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα, που έχουν επιμολυνθεί με τις διάφορες μορφές του pcDNA3.1-FlagC-HIF-1α και ξεπλένονται με PBS. Έπειτα στα κύτταρα προστίθενται 150 μl 1× PLB (Passive Lysis Buffer) και αφήνονται σε ανακινούμενη επιφάνεια για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να προκληθεί λύση τους. Στη συνέχεια τα προϊόντα λύσης συλλέγονται σε καθαρά σωληνάκια και φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις $14.000 \times g$.

Μετά τη λύση των κυττάρων ακολουθεί μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α με τον εξής τρόπο. Από το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης των κυτταρικών εκχυλισμάτων 20 μl μεταφέρονται σε 20 μl LAR II (Luciferase Assay Reagent II), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας και γίνεται μέτρηση της ενεργότητας της. Στη συνέχεια στο ίδιο σωληνάκι προστίθενται 10 μl 1× Stop & Glo, το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα της *Renilla* λουσιφεράσης και γίνεται η δεύτερη μέτρηση. Έτσι, στο συγκεκριμένο kit, η αντίδραση φωταύγειας από τη λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας μπορεί να απενεργοποιείται, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται η αντίδραση φωταύγειας της *Renilla* λουσιφεράσης.

Η κανονικοποιημένη μεταγραφική ενεργότητα του HIF-1 είναι ο λόγος ενεργότητα της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας/ενεργότητα της *Renilla* λουσιφεράσης.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κλωνοποίηση των διαφόρων μορφών του πλήρους μεγέθους HIF-1α στους πλασμιδιακούς φορείς pCMV2-Flag και pcDNA3.1-FlagC.

4.1.1. Κατεργασία του HIF-1α και των πλασμιδιακών φορέων με το ίδιο ένζυμο και σύνδεσή τους.

Στους πλασμιδιακούς φορείς pCMV2-Flag και pcDNA3.1-FlagC κλωνοποιούνται οι διάφορες μορφές του HIF-1α όπως φαίνονται στην εικόνα 2.1. Στον φορέα pcDNA3.1-FlagC εισήχθησαν όλες οι μορφές, ενώ στον pCMV2-Flag εισήχθησαν μόνο οι μορφές SE, IA και IA/SA καθώς οι υπόλοιπες ήταν ήδη κλωνοποιημένες στον φορέα αυτό από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου.

Πρώτο βήμα για την επίτευξη της κλωνοποίησης ήταν η δημιουργία συμπληρωματικών άκρων μεταξύ των πλασμιδιακών φορέων και των διαφόρων μορφών του πλήρους μεγέθους HIF-1α. Αυτό επιτυγχάνεται με κατεργασία του πλασμιδιακού DNA και του ενθέματος με το ίδιο ένζυμο περιορισμού, το οποίο στην προκειμένη περίπτωση ήταν το BamHI.

Όσον αφορά τους pCMV2-Flag και pcDNA3.1-FlagC, αυτοί αρχικά βρίσκονται σε κυκλική μορφή. Η ποσότητα του κάθε φορέα που υφίσταται κατεργασία με το ένζυμο BamHI είναι 20 μg. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται επιπλέον το ένζυμο περιορισμού, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και απιονισμένο νερό. Ενδεικτικά η αντίδραση διαμορφώθηκε ως εξής:

Πλασμιδιακό DNA:	10 μl
Buffer BamHI (10×):	5 μl
Ένζυμο BamHI:	1 μl
H ₂ O:	34 μl
<hr/>	
Ολικός όγκος :	50 μl

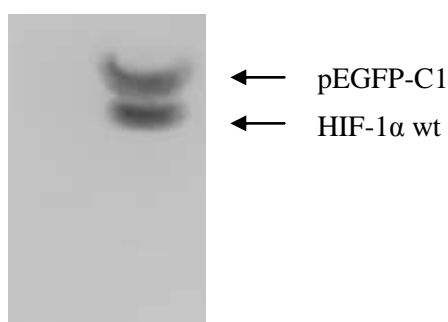
Μετά την πέψη με το ένζυμο BamHI, οι φορείς παραλαμβάνονται σε γραμμική μορφή με συμπληρωματικά άκρα, τα οποία φέρουν από μια φωσφορική ομάδα. Για το λόγο αυτό οι πλασμιδιακοί φορείς υφίστανται επίσης κατεργασία με αλκαλική φωσφατάση (1 μl CiP στην αντίδραση στο μέσο της πέψης), η οποία απομακρύνει τις

φωσφορικές ομάδες από τα άκρα τους, προκειμένου να αποφευχθεί η επανακυκλοποίησή τους, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3.

Όσον αφορά τον αγρίου τύπου HIF-1α και τις διάφορες μεταλλαγμένες μορφές του, αυτές αρχικά ήταν κλωνοποιημένες σε άλλον πλασμιδιακό φορέα (pEGFP-C1 – HIF-1α), από όπου και τις παραλαμβάνουμε με πέψη με BamHI, σε μια αντίδραση αντίστοιχη με αυτή που πραγματοποιήθηκε για τον πλασμιδιακό φορέα.

Πλασμιδιακό DNA:	10 μl (pEGFP-C1 – HIF-1α wt, SA, SE, IA, IA/SA)
Buffer BamHI (10×):	5 μl
Ένζυμο BamHI:	1 μl
H ₂ O:	34 μl
<hr/>	
Ολικός όγκος :	50 μl

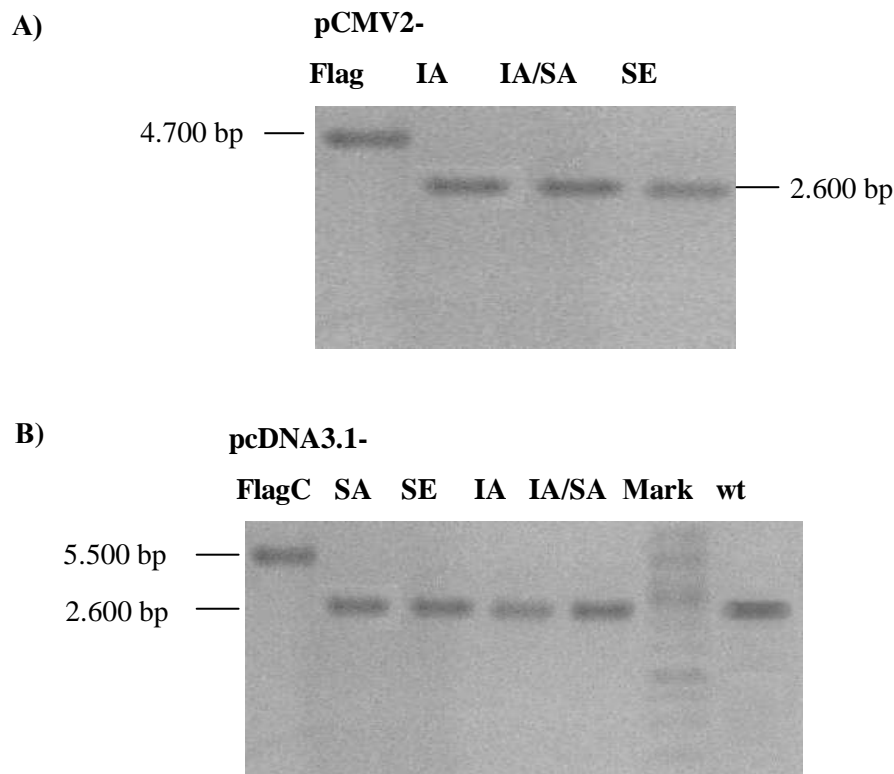
Στη συνέχεια, τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης και εξάγονται οι επιθυμητές ζώνες από την πηκτή. Ακολούθως το DNA ανακτάται με gel extraction kit, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.3. Ενδεικτικά η εικόνα που παίρνουμε από την ηλεκτροφόρηση του DNA των κατασκευών του HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-C1 μετά την πέψη με BamHI παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1.



Εικόνα 4.1: Αποτέλεσμα πέψης του πλασμιδιακού DNA pEGFP-C1 - HIF-1α wt. Από την πηκτή απομονώνεται η ζώνη που αντιστοιχεί στον HIF-1α και το DNA παραλαμβάνεται με χρήση gel extraction kit.

Επόμενο βήμα είναι η ποσοτικοποίηση του DNA που ανακτήθηκε από την πηκτή. Αυτό επιτυγχάνεται με ηλεκτροφόρηση μικρής ποσότητας του DNA (2 μl) σε πηκτή αгарόζης. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται χρησιμοποιώντας γνωστή

ποσότητα μάρτυρα και συγκρίνοντας την ένταση του σήματος των ζωνών του μάρτυρα με τα δείγματά μας.



Εικόνα 4.2: Ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού DNA **A)** pCMV2-Flag και **B)** pcDNA3.1-FlagC και των αντίστοιχων ενθεμάτων.

Είναι φανερό ότι η συγκέντρωση των διαφόρων μορφών του HIF-1α είναι περίπου ίδια μεταξύ τους μετά την πύση με BamHI.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά πραγματοποιείται η αντίδραση λιγάσης, το μίγμα της οποίας αποτελείται από ίδια συγκέντρωση του HIF-1α και του πλασμιδιακού φορέα, τη λιγάση, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και νερό, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.2. Με την αντίδραση λιγάσης επιτυγχάνεται η εισαγωγή των διαφόρων μορφών του HIF-1α στους πλασμιδιακούς φορείς, όπως παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των μεθόδων, εικόνα 3.3.

4.1.2. Απομόνωση μικρής κλίμακας του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού DNA pCMV2-Flag-HIF-1α και pcDNA3.1-FlagC-HIF-1α και έλεγχος της επιτυχίας κλωνοποίησης.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά με τα προϊόντα της αντίδρασης λιγάσης μετασχηματίζονται επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* TOP-10, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.4. Η παρουσία αντιβιοτικού αμικικιλίνη κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, διασφαλίζει την ανάπτυξη εκείνων και μόνο των κυττάρων που έχουν μετασχηματιστεί, καθώς το πλασμίδιο που έχουν προσλάβει τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των τριβλίων συλλέγονται η καθεμία χωριστά και αναπτύσσονται εκ νέου σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία αμικικιλίνης, με σκοπό να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA. Η απομόνωση πραγματοποιείται με αλκαλική λύση των βακτηριακών κυττάρων, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.5.

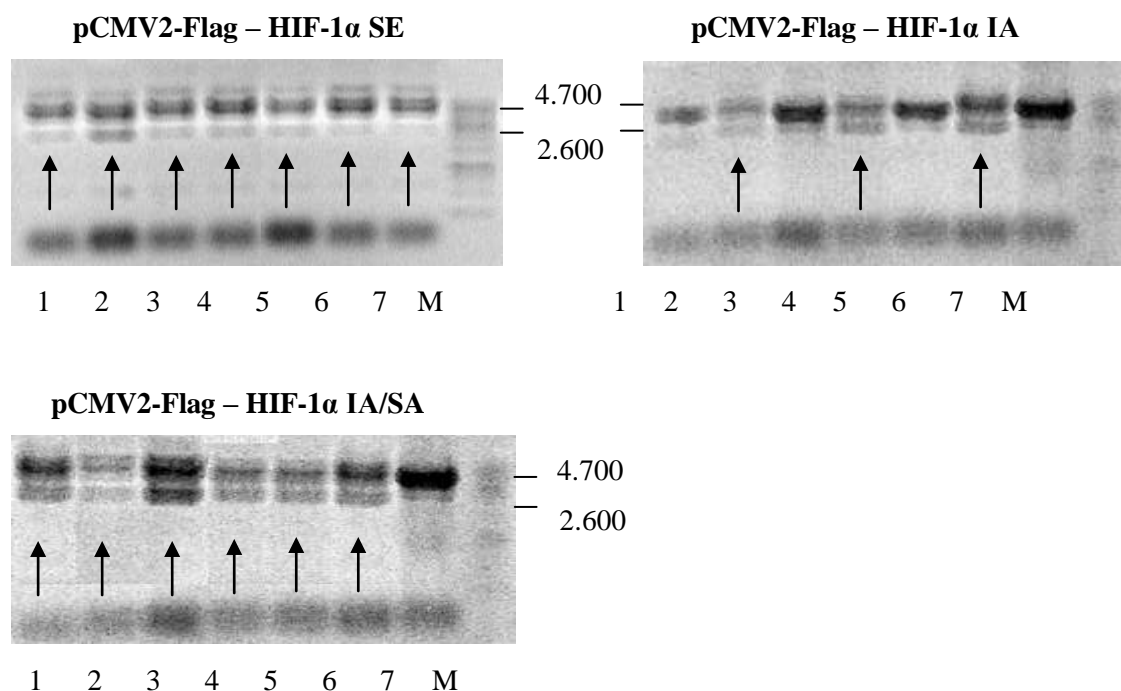
Εφόσον έχει απομονωθεί το μικρής κλίμακας πλασμιδιακό DNA, ελέγχεται η επιτυχία της κλωνοποίησης. Από την αντίδραση λιγάσης είναι δυνατό να παραληφθούν τριών ειδών προϊόντα: 1) πλασμίδια τα οποία επανακυκλοποιήθηκαν μόνα τους χωρίς να προσλάβουν ένθεμα, 2) πλασμίδια τα οποία έχουν προσλάβει ένθεμα με σωστό προσανατολισμό και 3) πλασμίδια τα οποία έχουν προσλάβει ένθεμα με λάθος προσανατολισμό, κάτι το οποίο είναι εφικτό εφόσον τα δύο άκρα είναι ίδια. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με πέψη του πλασμιδιακού DNA με πέψη με ένζυμο περιορισμού. Το DNA κάθε κλώνου / αποικίας ελέγχεται ξεχωριστά.

Ο πρώτος έλεγχος αφορά την εισαγωγή του ενθέματος HIF-1α στον πλασμιδιακό φορέα. Για το σκοπό αυτό για κάθε κλώνο πραγματοποιείται μια αντίδραση πέψης μικρής ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε με το ένζυμο περιορισμού BamHI. Η αντιδράσεις πέψης διαμορφώνονται ως εξής:

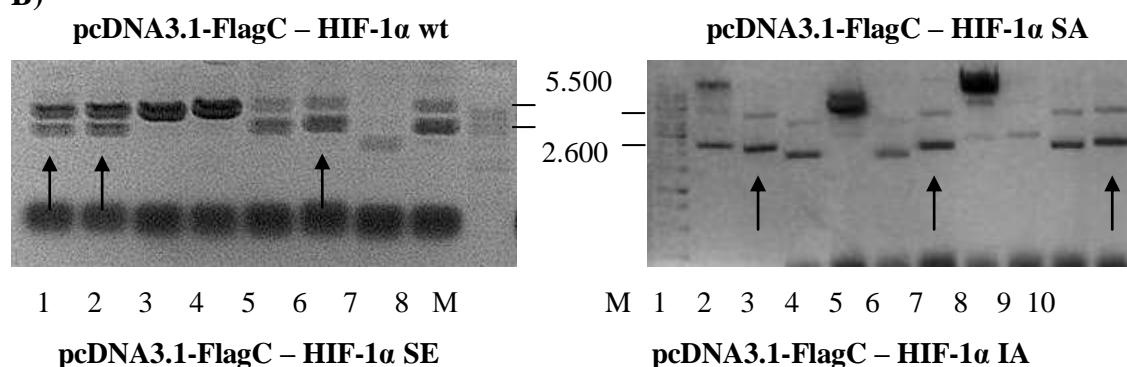
Πλασμιδιακό DNA:	2 μ l
Buffer BamHI (10 \times):	2 μ l
Ένζυμο BamHI:	0.25 μ l
H ₂ O:	15.75 μ l
<hr/>	
Ολικός όγκος :	20 μ l

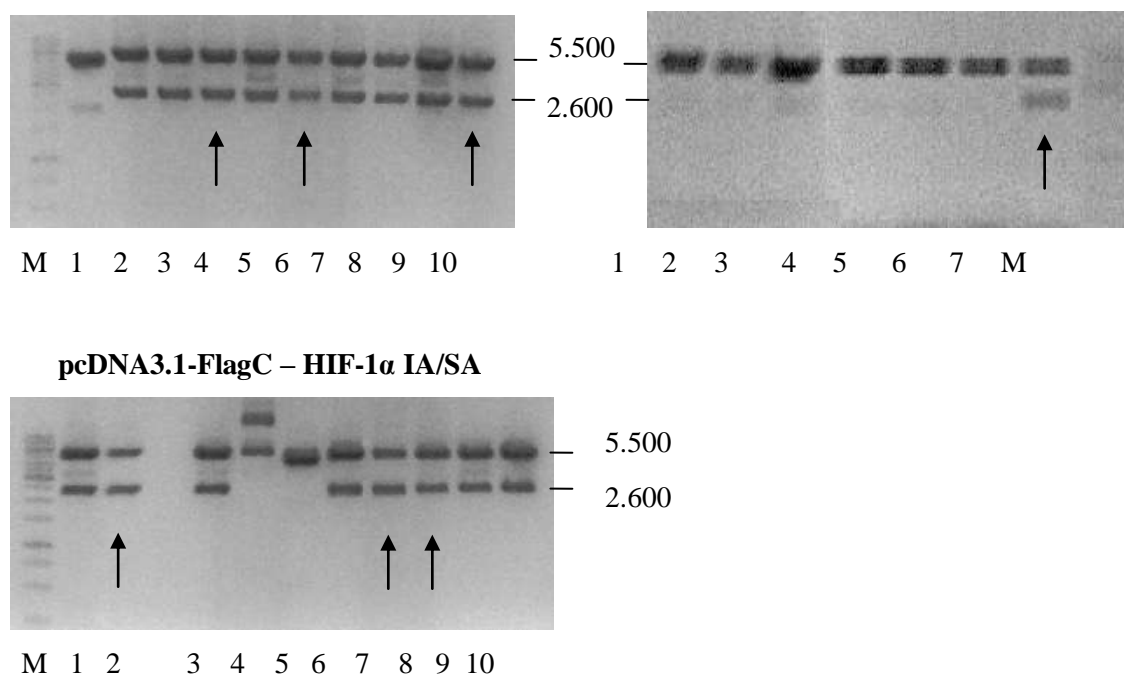
Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C και κατόπιν τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης. Στην περίπτωση όπου ο HIF-1α έχει εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pCMV2-Flag, από την πέψη θα προκύψουν δύο τμήματα DNA μεγέθους 4.700 και 2.600 bp, ενώ όπου ο HIF-1α έχει εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-FlagC, θα προκύψουν δύο τμήματα DNA μεγέθους 5.500 και 2.600 bp, δηλαδή θα παραληφθεί ο πλασμιδιακός φορέας και το ένθεμα εκ νέου, εφόσον το ένθεμα έχει εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα στη θέση πέψης του ενζύμου BamHI, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3. Στην περίπτωση όμως όπου ο HIF-1α δεν έχει εισαχθεί στον φορέα, τότε από την πέψη θα προκύψει ένα μόνο κομμάτι DNA μεγέθους 4.700 bp ή 5.500 bp που αντιστοιχεί στον πλασμιδιακό φορέα pCMV2-Flag ή pcDNA3.1-FlagC αντίστοιχα.

A)



B)



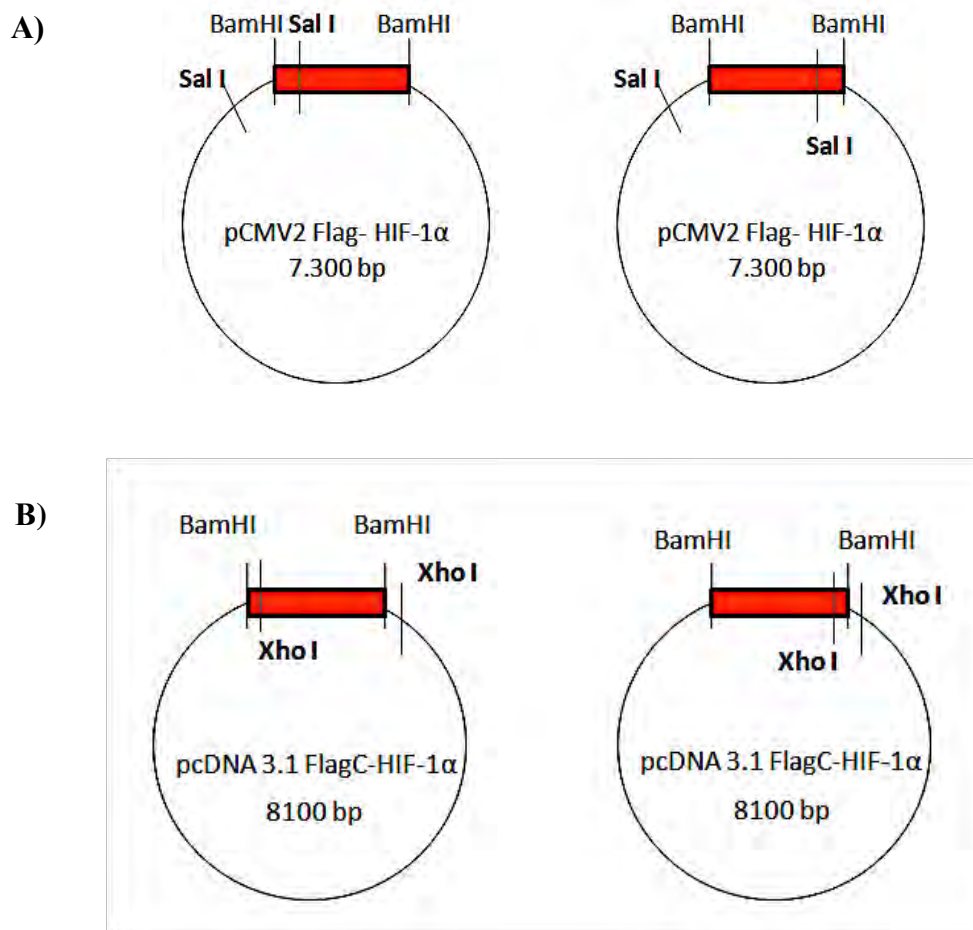


Εικόνα 4.3: Φωτογραφίες από την πηκτική αгарόζης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με BamHI για τον έλεγχο εισαγωγής του HIF-1α **A)** στον φορέα pCMV2-Flag και **B)** στον φορέα pcDNA3.1-FlagC. Με βέλη υποδεικνύονται οι κλώνοι που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο cDNA.

Εφόσον έχει ολοκληρωθεί ο πρώτος έλεγχος κι έχουν επιλεγθεί οι κλώνοι που έχουν προσλάβει πλασμίδιο με ένθεμα, γι' αυτούς πραγματοποιείται ο δεύτερος έλεγχος, ο οποίος αφορά τον προσανατολισμό του ενθέματος μέσα στον πλασμιδιακό φορέα. Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 3.2.2, και τα δύο άκρα του HIF-1α είναι ίδια μεταξύ τους και με τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα, εφόσον έχουν υποστεί κατεργασία με το ίδιο ένζυμο. Έτσι λοιπόν ο HIF-1α είναι δυνατόν να εισαχθεί στον φορέα είτε με σωστό ($5' \rightarrow 3'$), είτε με λανθασμένο ($3' \rightarrow 5'$) προσανατολισμό. Στην περίπτωση που εισαχθεί με λάθος προσανατολισμό, ο HIF-1α δεν μπορεί να εκφραστεί, κι επομένως είναι σημαντικό για την πορεία της εργασίας να διακρίνουμε και να επιλέξουμε το πλασμιδιακό DNA που περιέχει τον HIF-1α σε σωστό προσανατολισμό.

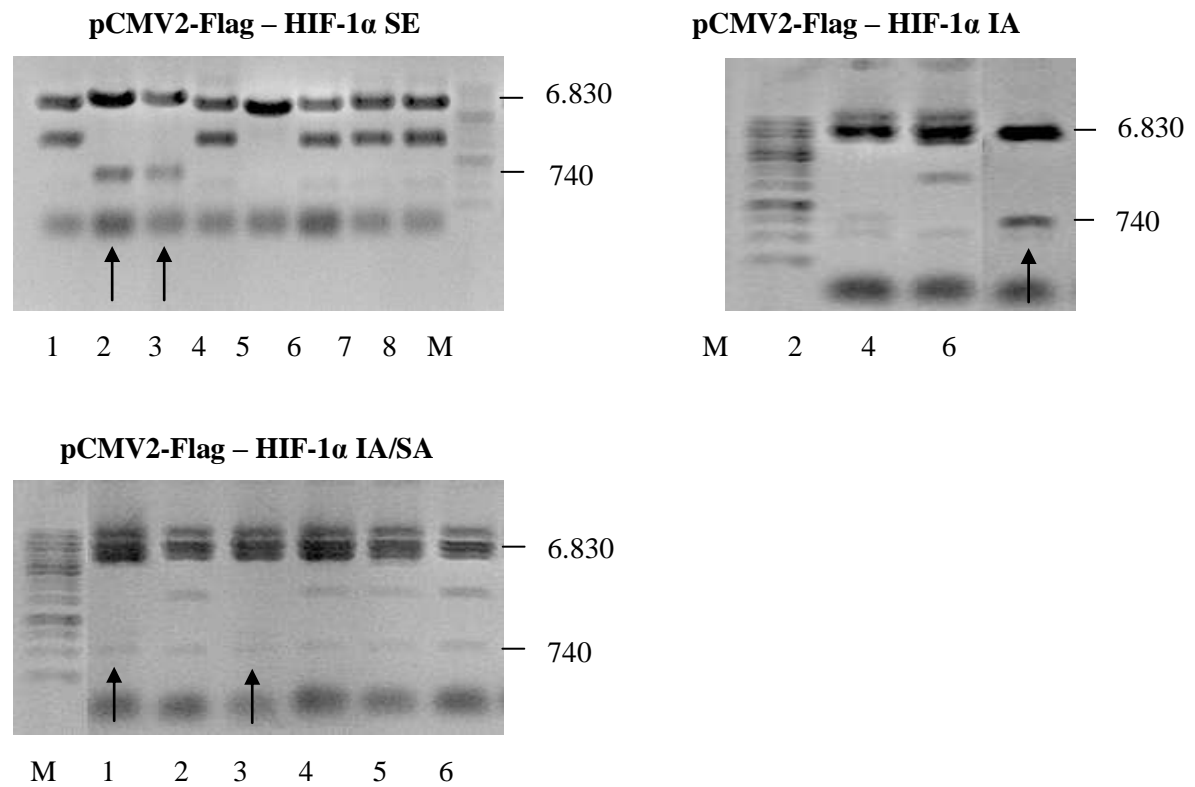
Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται και πάλι αντίδραση πέψης με τα ένζυμα περιορισμού SalI στην περίπτωση του φορέα pCMV2-Flag και XhoI στην περίπτωση του pcDNA3.1-FlagC. Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζονται οι θέσεις πέψης του

ενθέματος και του πλασμιδιακού φορέα από τα ένζυμα αυτά καθώς και το αποτέλεσμα της πέψης στις περιπτώσεις σωστού και λάθος προσανατολισμού.

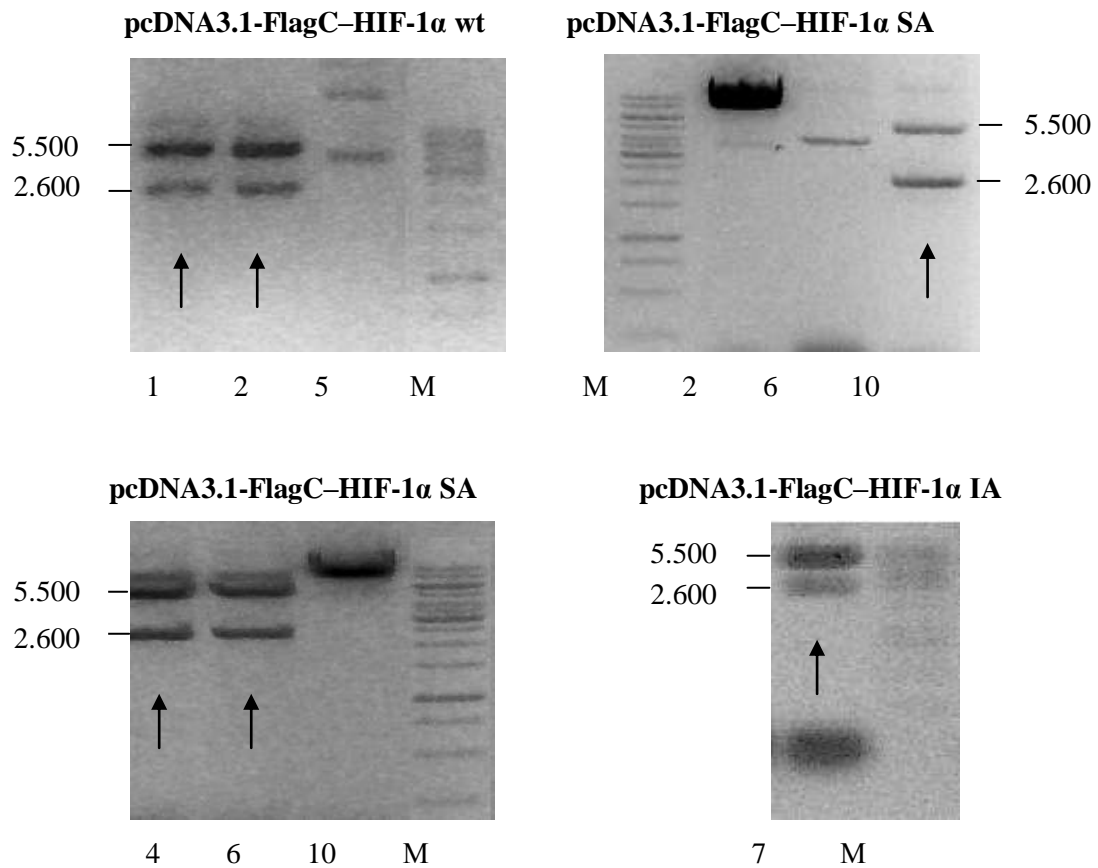


Εικόνα 4.4: Το αποτέλεσμα της πέψης του ανασυνδυασμένου DNA με ένζυμο περιορισμού στην περίπτωση όπου το γονίδιο του HIF-1α έχει κλωνοποιηθεί στο φορέα, με σωστό ή με λάθος προσανατολισμό. **A) Πλασμιδιακός φορέας pCMV2-Flag και ένζυμο περιορισμού SalI:** Στην περίπτωση **σωστού** προσανατολισμού προκύπτουν τμήματα DNA μεγέθους **6.830 bp** και **740 bp**, ενώ στην περίπτωση **λάθος** προσανατολισμού 5.330 bp και 1970 bp. **B) Πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1-FlagC και ένζυμο περιορισμού XhoI:** Στην περίπτωση **σωστού** προσανατολισμού προκύπτουν τμήματα DNA μεγέθους **5.500 bp** και **2.600 bp**, ενώ στην περίπτωση **λάθος** προσανατολισμού 8.000 bp και 100bp.

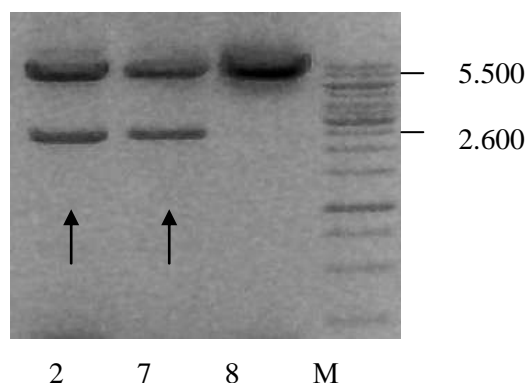
A)



B)



pcDNA3.1-FlagC-HIF-1α IA/SA



Εικόνα 4.5: Φωτογραφίες από την πηκτή αγαρόζη. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου του προσανατολισμού του HIF-1α στον αντίστοιχο πλασμιδιακό φορέα. **A)** Στην περίπτωση σωστού προσανατολισμού στον **pCMV2-Flag** προκύπτουν από την πέψη με **SalI** δύο τμήματα DNA μεγέθους **6.830 bp** και **740 bp**. **B)** Στην περίπτωση σωστού προσανατολισμού στον **pcDNA3.1-FlagC** προκύπτουν από την πέψη με **XhoI** δύο τμήματα DNA μεγέθους **5.500 bp** και **2.600 bp**. Με βέλη υποδεικνύονται οι κλώνοι όπου ο HIF-1α έχει εισαχθεί στον εκάστοτε πλασμιδιακό φορέα με σωστό προσανατολισμό.

4.1.3. Καθαρισμός μεσαίας κλίμακας του pCMV2-Flag-HIF-1α και pcDNA3.1-FlagC-HIF-1α.

Για τις διάφορες μορφές του HIF-1α, επιλέγεται ένας από τους κλώνους όπου το ένθεμα έχει εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα με σωστό προσανατολισμό και δημιουργείται νέα υγρή καλλιέργεια των κυττάρων, προκειμένου να απομονωθεί μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακό DNA. Ταυτόχρονα με την απομόνωση πραγματοποιείται και ο καθαρισμός του DNA, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.6.

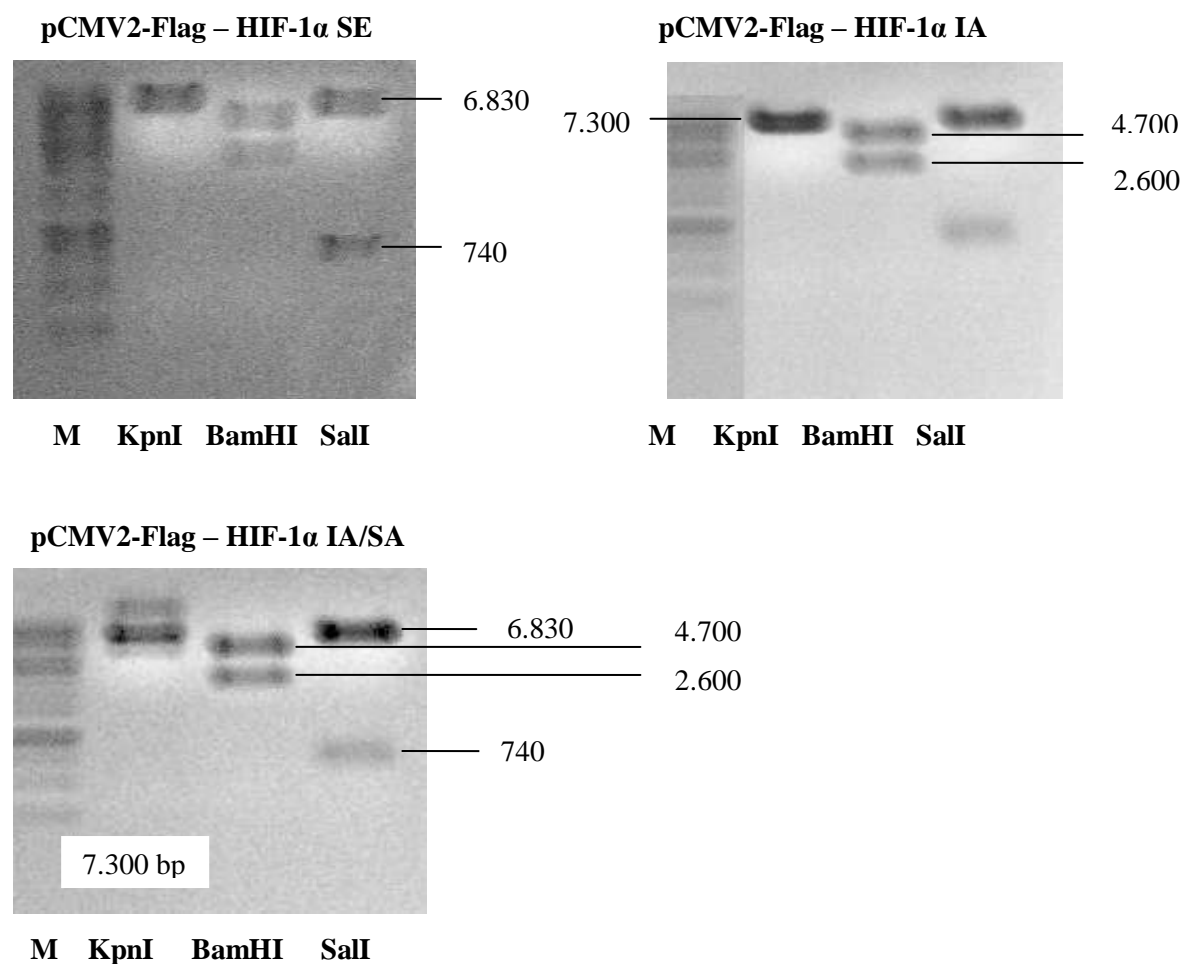
Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκ νέου έλεγχος της κλωνοποίησης με πέψη των διαφόρων μορφών πλασμιδιακού DNA με τα ένζυμα **BamHI** το οποίο θα αποδείξει την εισαγωγή ενθέματος στον φορέα, με **SalI** ή **XhoI** το οποίο θα αποδείξει το σωστό προσανατολισμό του ενθέματος μέσα στον φορέα και τέλος με **KpnI** το οποίο έχει μόνο μία θέση πέψης μέσα στο πλασμιδιακό DNA έτσι ώστε να προκύψει γραμμικό DNA με μέγεθος το άθροισμα του πλασμιδίου και του ενθέματος, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.3.

Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει μικρή ποσότητα του καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA, το ένζυμο περιορισμού, το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα σε κάθε περίπτωση και απιονισμένο νερό, και διαμορφώνεται ως εξής:

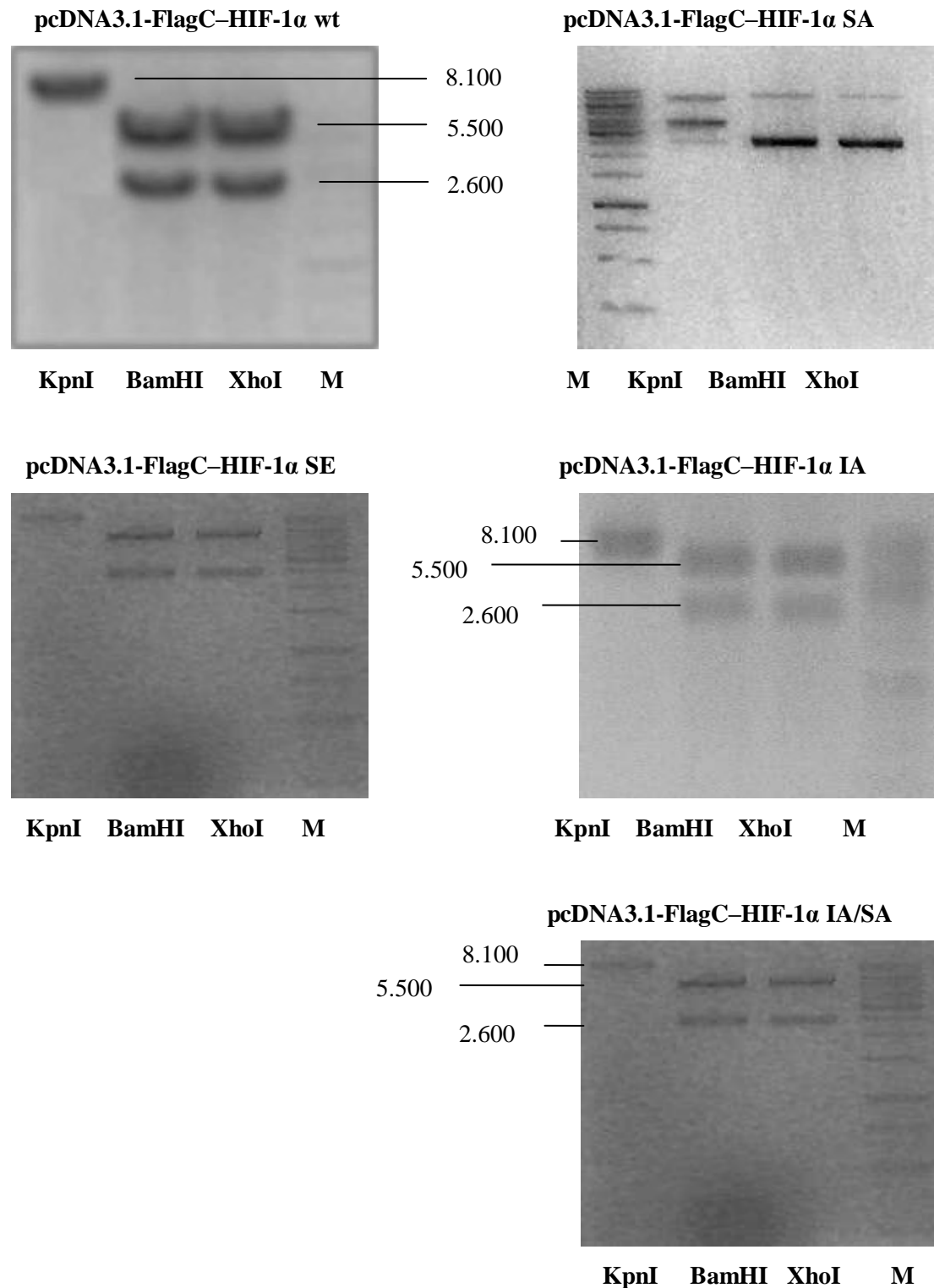
Πλασμιδιακό DNA:	2 μ l
Ρυθμιστικό διάλυμα (10 \times):	2 μ l
Ένζυμο περιορισμού:	0.25 μ l
H ₂ O:	15.75 μ l
Ολικός όγκος :	20 μ l

Μετά την ολοκλήρωση της πέψης τα προϊόντα της ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί.

A)



B)

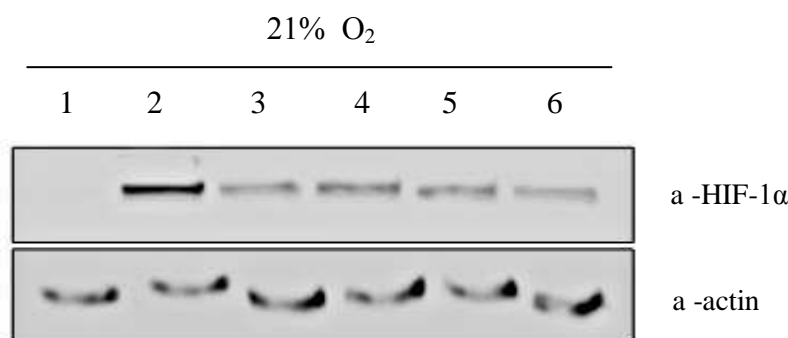


Εικόνα 4.6: Φωτογραφίες από πηκτή αγαρόζης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ελέγχου της κλωνοποίησης μετά την απομόνωση του καθαρού πλασμιδιακού DNA **A)** pCMV2-Flag – HIF-1α και **B)** pcDNA3.1-FlagC – HIF-1α. Στην πρώτη στήλη φαίνεται το γραμμικό DNA, στη δεύτερη στήλη ο έλεγχος εισαγωγής του ενθέματος στον φορέα και στην τρίτη στήλη ο έλεγχος προσανατολισμού του ενθέματος.

Σε αυτό το σημείο έχει ολοκληρωθεί ο έλεγχος και γνωρίζουμε πλέον ότι η κλωνοποίηση των διαφόρων μορφών του HIF-1α στους pCMV2-Flag και pcDNA3.1-FlagC έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία. Τελευταίο βήμα είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε και καθαρίστηκε με φωτομέτρηση στα 260 nm.

4.2. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa χρησιμοποιώντας τις κατασκευές pCMV2-Flag – HIF-1α.

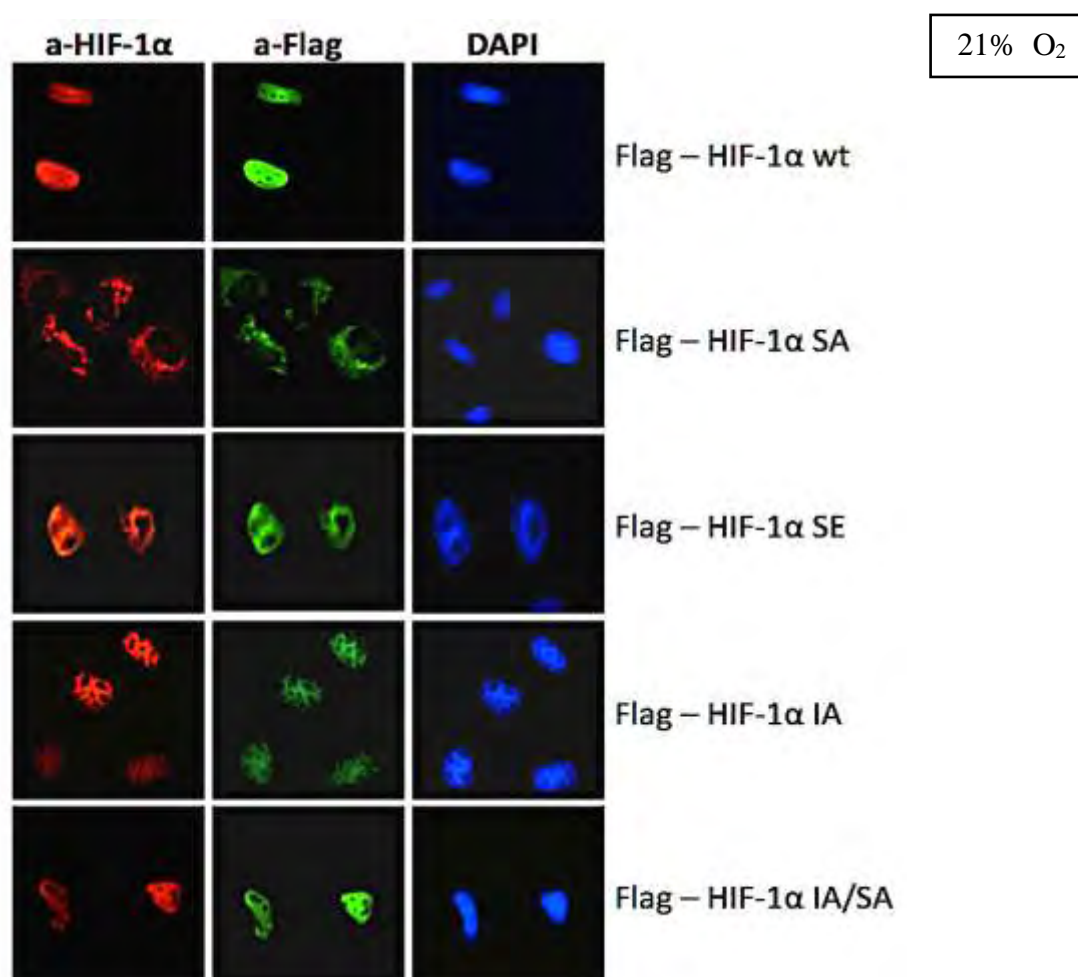
Προκειμένου να ελέγξουμε την έκφραση των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, αρχικά κύτταρα HeLa καλλιεργούνται σε πιάτα 6 οπών (6well plates) διαμέτρου 35mm, για 24 ώρες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επιμόλυνσή των κυττάρων με το πλασμιδιακό DNA, pCMV2-FlagC – HIF-1α (wt, SA, SE, IA και IA/SA), όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.8. Μετά από επώαση για 24 ώρες σε 21% O₂, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.9.1, και η έκφραση των Flag-χμαιορικών πρωτεϊνών ελέγχεται στο συνολικό εκχύλισμα των κυττάρων, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.9.



Εικόνα 4.7: Έλεγχος έκφρασης των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε κύτταρα HeLa με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στη διαδρομή 1 παρουσιάζεται το control δείγμα, που πρόκειται για τον πλασμιδιακό φορέα pCMV2-Flag, στη διαδρομή 2 παρουσιάζεται η έκφραση του αγρίου τύπου HIF-1α, στη διαδρομή 3 παρουσιάζεται η μορφή HIF-1α SA, στη διαδρομή 4 η μορφή HIF-1α SE, στη διαδρομή 5 η μορφή HIF-1α IA και στη διαδρομή 6 η μορφή HIF-1α IA/SA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλες οι μορφές του HIF-1α εκφράζονται σε κύτταρα HeLa όπου ο αγρίου τύπου HIF-1α εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τις μεταλλαγμένες μορφές του οι οποίες μεταξύ τους παρουσιάζουν τα ίδια επίπεδα έκφρασης.

Ο εντοπισμός της θέσης των διαφόρων μορφών του HIF-1α μέσα στο κύτταρο γίνεται με έμμεσο ανοσοφθορισμό, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.10. Για το σκοπό αυτό, αρχικά τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν πάνω σε καλυπτρίδες για 24 ώρες. Έπειτα, διαμολύνονται με πλασμιδιακό DNA, pCMV2-Flag – HIF-1α (wt, SA, SE, IA και IA/SA), σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.8. Κατόπιν, επωάζονται για 24 ώρες στους 37°C σε 21% O₂. Τα αποτελέσματα ανίχνευσης του υποκυτταρικού εντοπισμού των μορφών του FLAG-HIF-1α παρουσιάζονται στην εικόνα 4.8.



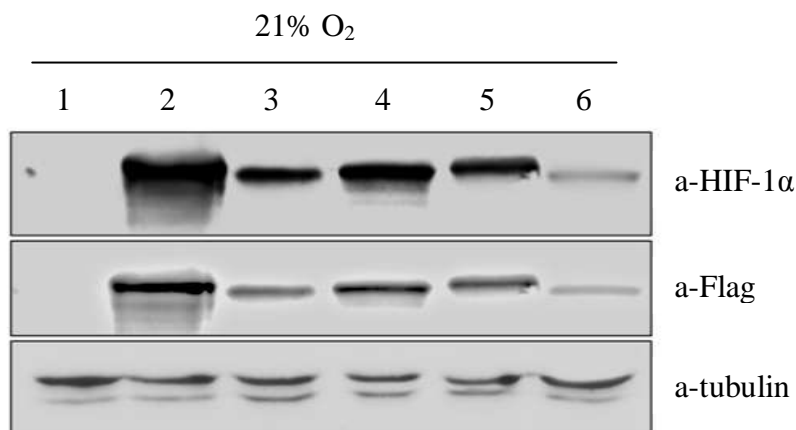
Εικόνα 4.8: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Στο κόκκινο κανάλι φαίνεται ο FLAG-HIF-1α με αντίσωμα ενάντια στον HIF-1α, ενώ στο πράσινο κανάλι με αντίσωμα ενάντια στον FLAG

επίτοπο. Στο μπλε κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά από χρώση με τη χρωστική DAPI.

Με βάση τα αποτελέσματα οι μορφές HIF-1α wt, HIF-1α SE, HIF-1α IA και HIF-1α IA/SA εντοπίζονται στον πυρήνα, ενώ η μορφή HIF-1α SA στο κυτταρόπλασμα.

4.3. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού του HIF-1α σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa και HEK293T χρησιμοποιώντας τις κατασκευές pcDNA3.1-FlagC – HIF-1α.

Η μελέτη της έκφρασης και λειτουργίας των διαφόρων μορφών του HIF-1α έγινε σε κύτταρα HEK293T, μετά από επιμόλυνση με το πλασμιδιακό DNA, pcDNA3.1-FlagC – HIF-1α (wt, SA, SE, IA και IA/SA). Η επιλογή του συγκεκριμένου φορέα ήταν απαραίτητη, καθώς, αυτός ο φορέας εκτός του FLAG πεπτιδίου, φέρει και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό επιλογής σε κύτταρα θηλαστικών. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία (παράγραφος 4.2), σε συνθήκες νορμοξίας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί.

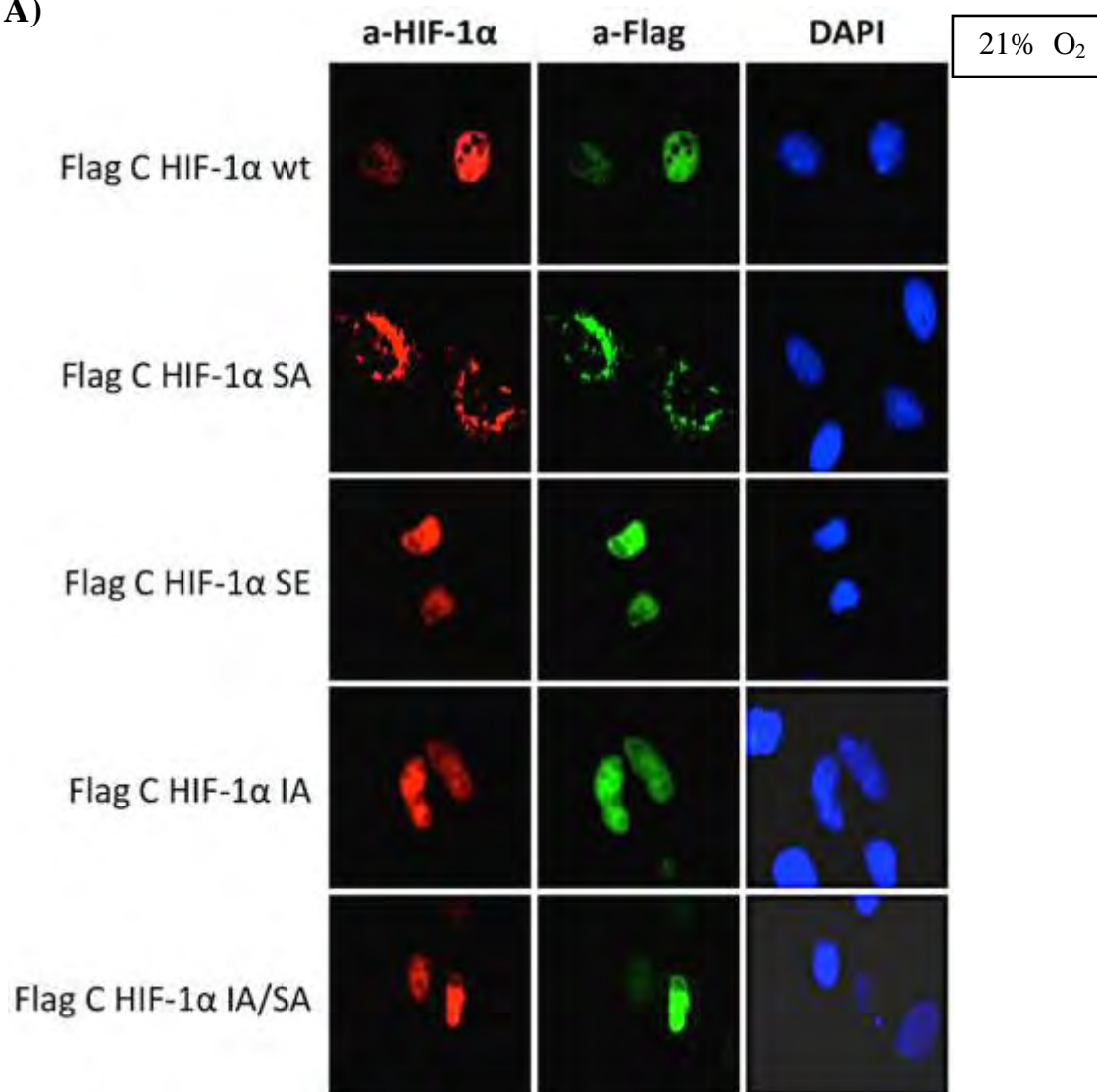


Εικόνα 4.9: Έλεγχος έκφρασης των διαφόρων μορφών του HIF-1α με τον επίτοπο FLAG σε κύτταρα HEK293T με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στη διαδρομή **1** παρουσιάζεται το control δείγμα, που πρόκειται για τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1-FlagC, στη διαδρομή **2** παρουσιάζεται η έκφραση του αγρίου τύπου HIF-1α, στη διαδρομή **3** παρουσιάζεται η μορφή HIF-1α SA, στη διαδρομή **4** η μορφή HIF-1α SE, στη διαδρομή **5** η μορφή HIF-1α IA και στη διαδρομή **6** η μορφή HIF-1α IA/SA.

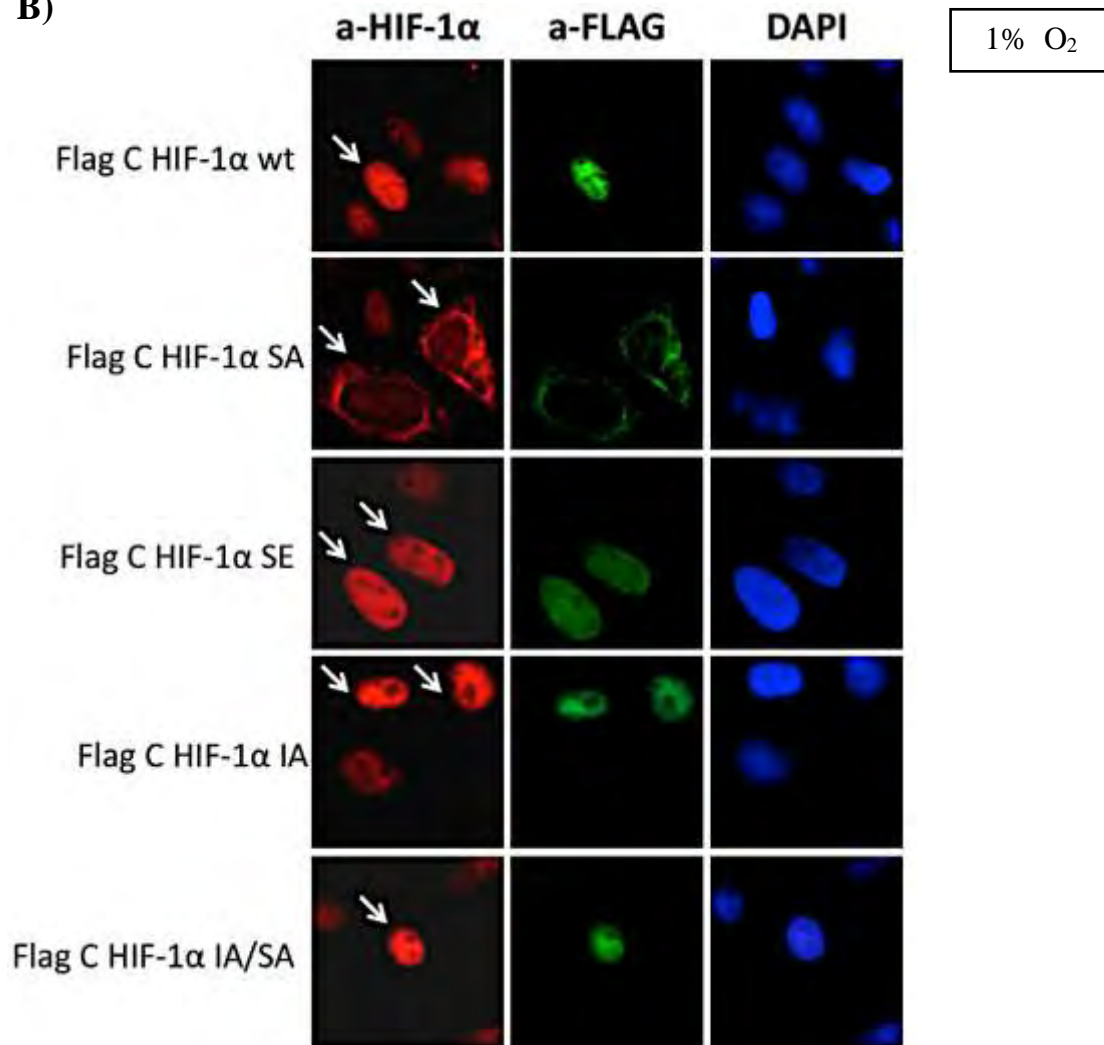
Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξαν επαγωγή της έκφρασης των αντίστοιχων μορφών του HIF-1α στις διαδρομές 2, 3, 4 και 5, ενώ στη διαδρομή 6 (FLAG-HIF-1α IA/SA) παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση. Μάλιστα τα επίπεδα πρωτεΐνης στη διαδρομή 2 (αγρίου τύπου FLAG-HIF-1α) είναι αυξημένα σε σχέση με τις υπόλοιπες διαδρομές. Το πείραμα επαναλήφθηκε δεύτερη φορά με παρόμοιο αποτέλεσμα.

Όσον αφορά τον έλεγχο του υποκυτταρικού εντοπισμού, αυτός γίνεται σε κύτταρα HeLa και ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 4.2. Αυτή τη φορά τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό DNA, υποβλήθηκαν εκτός της νορμοξίας και σε υποξία (1% O₂) για 4 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.10.

A)



B)



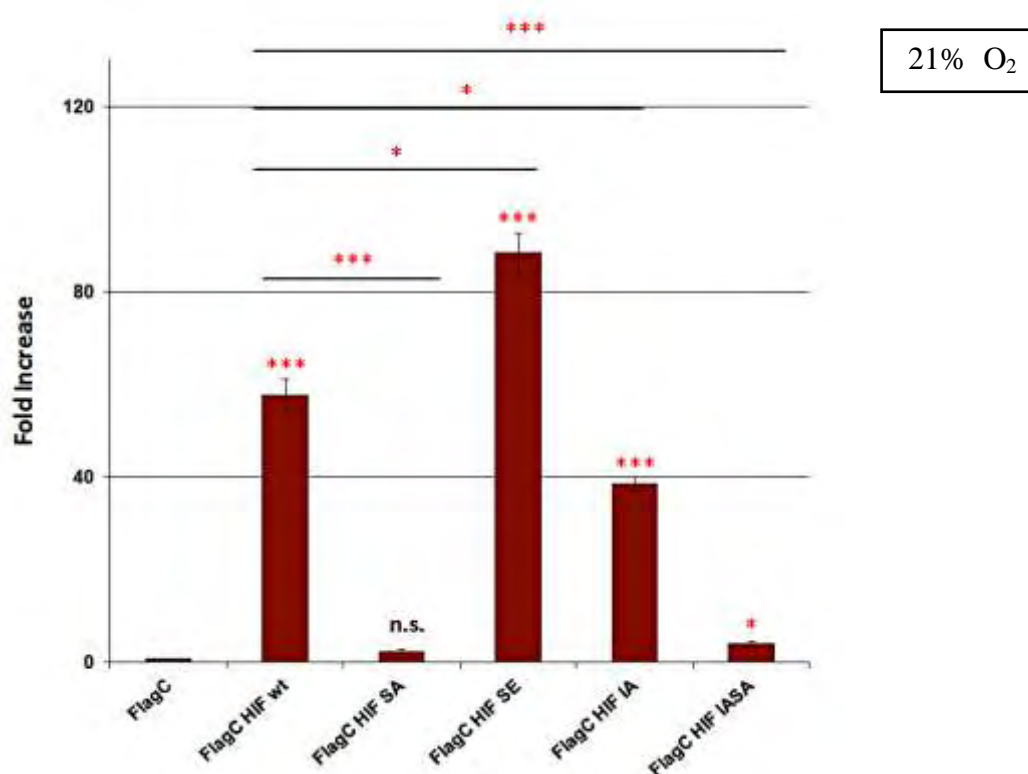
Εικόνα 4.10: Έλεγχος υποκυτταρικού εντοπισμού των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε κύτταρα HeLa με έμμεσο ανοσοφθορισμό. Στο κόκκινο κανάλι φαίνεται ο HIF-1α με αντίσωμα ενάντια στον HIF-1α, ενώ στο πράσινο κανάλι με αντίσωμα ενάντια στον FLAG επίτοπο. Στο μπλε κανάλι φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων μετά από χρώση με τη χρωστική DAPI. **A)** Επώαση σε 21% O₂ και **B)** Επώαση σε 1% O₂ (με βέλη επισημαίνονται τα κύτταρα που εκφράζουν τον εξωγενή HIF-1α).

Τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία παρατηρήθηκε ότι ο αγρίου τύπου HIF-1α καθώς και οι μεταλλαγμένες μορφές HIF-1α SE, HIF-1α IA και HIF-1α IA/SA, εμφανίζουν πυρηνικό εντοπισμό, σε αντίθεση με τη μορφή HIF-1α SA η οποία παρουσιάζεται στο κυτταρόπλασμα. Μάλιστα στην υποξία γίνεται εμφανής και ο ενδογενής HIF-1α ο οποίος επάγεται από τη μειωμένη συγκέντρωση O₂. Παρόλα αυτά μπορούν να γίνουν διακριτά τα κύτταρα (λευκά βέλη) που εκφράζουν τον

εξωγενή HIF-1α, καθώς εμφανίζουν εντονότερο σήμα, αφού HIF-1α βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτά.

4.4. Έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας του HIF-1α.

Ανθρώπινα κύτταρα HEK293T αναπτύσσονται για 24 ώρες σε πιάτα 12 οπών διαμέτρου 22 mm και διαμολύνονται με τις διάφορες μορφές του pcDNA3.1-FlagC – HIF-1α καθώς και με πλασμίδια που έφεραν τις Firefly luciferase και *Renilla* luciferase, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.8. Έπειτα τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες και ακολουθεί λύση τους και μέτρηση της μεταγραφικής ενεργότητας των διαφόρων μορφών του HIF-1α, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.11. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα που ακολουθεί. Οι τιμές των αποτελεσμάτων αποτελούν το μέσο όρο 9 τιμών.



Εικόνα 4.11: Μεταγραφική ενεργότητα των διαφόρων μορφών του HIF-1α σε κύτταρα HEK293T σε συνθήκες νορμοξίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πολλαπλάσια μεταβολή σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς FlagC (control) και αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο 9 τιμών. Επιπλέον παρουσιάζεται η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων σε σχέση με το control (*) και σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α (*). *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

Το αποτέλεσμα των μετρήσεων έδειξε ότι η μορφή του HIF-1α που φέρει τη φωσφομιμητική μετάλλαξη SE εμφανίζει την υψηλότερη μεταγραφική ενεργότητα, ακόμη και σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α. Αρκετά ψηλή μεταγραφική ενεργότητα εμφανίζει και η μορφή IA με μικρή διαφορά από τον αγρίου τύπου HIF-1α, ενώ οι μορφές SA και IA/SA παρουσιάζουν πολύ χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών όσο και σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Προκειμένου να διαλευκανθεί περαιτέρω ο ρόλος του σε αυτές τις καταστάσεις, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τους μηχανισμούς ρύθμισής του. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί αρκετοί μηχανισμοί ρύθμισης του HIF-1 υποδεικνύοντας την πολυπλοκότητα και την προσαρμοστικότητα των κυττάρων σε διάφορα ερεθίσματα.

Ο HIF-1α εκφράζεται συνεχώς σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου υφίσταται ρύθμιση από τις PHD και FIH από τις οποίες υδροξυλιώνεται και αποικοδομείται ταχύτατα στο πρωτεάσωμα, ενώ κατά την υποξία ο HIF-1α σταθεροποιείται και καθίσταται μεταγραφικά ενεργός. Εκτός από την οξυγονο-εξαρτώμενη ρύθμιση, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου ο HIF-1α ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής, σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης, σε επίπεδο σταθερότητας/αποικοδόμησης και σε επίπεδο της μεταφοράς στον πυρήνα. Στις διαδικασίες αυτές σημαντικό ρόλο παίζουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του HIF-1α, μεταξύ των οποίων η φωσφορυλίωση.

Σημαντικό ρόλο παίζει η φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις MAPK. Όπως είναι γνωστό από παλαιότερη δουλειά του εργαστηρίου Βιοχημείας, οι p44/p42 MAPK φωσφορυλιώνουν τον HIF-1α στις Ser⁶⁴¹ και Ser⁶⁴³, γεγονός που προκαλεί την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας [49]. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της απόκρυψης ενός γειτονικού στις θέσεις φωσφορυλίωσης NES, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση της εξαπορτίνης CRM1 στον HIF-1α και αυτός να συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου μετά τον διμερισμό του με τον ARNT επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων [1].

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η συμπεριφορά των διαφόρων μορφών του HIF-1α που παρουσιάζονται στην εικόνα 2.1, σε σύντηξη με την αλληλουχία FLAG, σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τόσο στη νορμοξία όσο και στην υποξία, οι μεταλλαγμένες μορφές SE, IA και IA/SA καθώς και ο αγρίου τύπου HIF-

1α εμφανίζονται στον πυρήνα, ενώ αντίθετα η μορφή SA εμφανίζεται στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων HeLa (Εικ. 4.8 και 4.10). Η μορφή SE συσσωρεύεται στον πυρήνα καθώς, ως φωσφομιμητική μετάλλαξη, προσομοιάζει τη φωσφορυλίωση του HIF-1α από τις p44/p42 MAPK. Ομοίως οι μορφές IA και IA/SA εντοπίζονται στον πυρήνα αφού σε αυτές έχει γίνει μετάλλαξη τριών αμινοξέων του σήματος εξόδου από τον πυρήνα. Αντίθετα, η μορφή SA αποκλείεται από τον πυρήνα, εφόσον στη συγκεκριμένη μορφή έχουν μεταλλαχθεί οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης από τις p44/p42 MAPK, κι έτσι ο HIF-1α μετά την εισαγωγή του στον πυρήνα εξάγεται αμέσως μέσω της αλληλεπίδρασης με την CRM1. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου [1] σχετικά με τον έλεγχο του υποκυτταρικού εντοπισμού των μορφών του HIF-1α, οι οποίες όμως ήταν σε σύντηξη με την αλληλουχία GFP. Συμπερασματικά, η διαφορά μεγέθους των επιτόπων με τους οποίους βρίσκεται σε σύντηξη ο HIF-1α δεν επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των μορφών αυτών.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η έκφραση των χιμαιρικών πρωτεϊνών των παραπάνω μορφών του HIF-1α σε κύτταρα HeLa (pCMV2-FLAG) και HEK293T (pcDNA3.1-FLAG) καθώς και η μεταγραφική τους ενεργότητα (pcDNA3.1-FLAG-HIF). Η μορφή SE εκφράζεται στα κύτταρα αυτά (Εικ. 4.9), και μάλιστα παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α (Εικ. 4.11). Η μορφή SA, αν και εμφανίζει λίγο μικρότερη έκφραση σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α (Εικ. 4.9.), είναι σχεδόν ανενεργή (Εικ. 4.11), καθώς εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 4.10). Η μορφή IA παρουσιάζει λίγο μικρότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α κάτι το οποίο δικαιολογεί την λίγο μικρότερη μεταγραφικής ενεργότητας σε σχέση με τον αγρίου τύπου HIF-1α. Παρόμοια αποτελέσματα ενεργότητας είχαν παρατηρηθεί για τις αντίστοιχες μορφές του HIF-1α που φέρουν την αλληλουχία GFP [1].

Αντίθετα, η μορφή IA/SA αν και εντοπίζεται στο σωστό υποκυτταρικό διαμέρισμα, εμφανίζει πολύ περιορισμένη έκφραση (Εικ. 4.9) και πολύ χαμηλή μεταγραφική ενεργότητα (Εικ. 4.11). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα προηγούμενα αποτελέσματα μελέτης της έκφρασης και ενεργότητας της χιμαιρικής GFP – HIF-1α IA/SA πρωτεΐνης [1]. Η μικρή έκφραση μπορεί να εξηγηθεί λόγω μικρής επιτυχίας της διαδικασίας διαμόλυνσης. Αλλά, επειδή το πείραμα επαναλήφθηκε με το ίδιο αποτέλεσμα και η διαμόλυνση στα πειράματα μέτρησης μεταγραφικής ενεργότητας ελέγχεται με τη *Renilla* λουσιφεράση, πιθανά, η

παρατηρούμενη διαφορά με προηγούμενες μελέτες οφείλεται στο μέγεθος της αλληλουχίας σύντηξης. Στην παρούσα μελέτη δεν υπάρχει σε σύντηξη η αλληλουχία GFP που λόγω μεγέθους (25 kD) ίσως προκαλούσε τη σταθεροποίησή της συγκεκριμένης μορφής. Η αλληλουχία FLAG που χρησιμοποιήθηκε έχει πολύ μικρό μέγεθος (8 αμινοξέα) και προφανώς δεν μεταβάλλει σημαντικά τη δομή άρα και σταθερότητα των πρωτεϊνών. Έτσι η μορφή IA/SA, η οποία φέρει πέντε μεταλλάξεις σε μια πολύ περιορισμένη περιοχή, πιθανά να είναι αρκετά ασταθής. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν με βάση τις παρατηρήσεις της κας Μαρίας Κούρτη, υποψήφιας διδάκτορα του εργαστηρίου, η οποία μελετά την μικρή περιοχή MTD του HIF-1α. Παρατηρήθηκε, ότι η επιμόλυνση με τη συγκεκριμένη κατασκευή (FLAG-MTD IA/SA) προκαλούσε το θάνατο των κυττάρων της καλλιέργειας σε οποιαδήποτε κυτταρική σειρά δοκιμάστηκε (Kourti et al., αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Άρα αντίστοιχα, και η πλήρους μεγέθους μορφή HIF-1α IA/SA, πιθανά, να μην είναι ανεκτή από τα κύτταρα και, έτσι, να μην είναι δυνατό να δούμε την μορφή αυτή να εκφράζεται ποσοτικά.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, οι συγκεκριμένες κατασκευές (εκτός της IA/SA) θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για τη δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Οι κυτταρικές αυτές σειρές που θα εκφράζουν τις διάφορες μορφές του HIF-1α θα δώσουν πολύτιμες πληροφορίες για την περαιτέρω μελέτη της φωσφορυλίωσης του HIF-1α από τις p44/p42 MAPK και την επίδραση που αυτή έχει στον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mylonis, I., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. (2008) Atypical CRM1-dependent nuclear export signal mediates regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by MAPK, *J Biol Chem.* **283**: 27620-7.
2. Semenza, G. L. (2013) Advances in cancer biology and therapy, *Journal of molecular medicine.* **91**: 409.
3. Dengler, V. L., Galbraith, M. D. & Espinosa, J. M. (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* **49**: 1-15.
4. Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. (2012) HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression, *Nat Rev Cancer.* **12**: 9-22.
5. Greer, S. N., Metcalf, J. L., Wang, Y. & Ohh, M. (2012) The updated biology of hypoxia-inducible factor, *EMBO J.* **31**: 2448-60.
6. Majmundar, A. J., Wong, W. J. & Simon, M. C. (2010) Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress, *Mol Cell.* **40**: 294-309.
7. Semenza, G. L. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine, *Cell.* **148**: 399-408.
8. Heikkila, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. (2011) Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha variants in the hypoxia response, *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* **68**: 3885-901.
9. Pasanen, A., Heikkila, M., Rautavuoma, K., Hirsila, M., Kivirikko, K. I. & Myllyharju, J. (2010) Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2, *The international journal of biochemistry & cell biology.* **42**: 1189-200.
10. Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W. J., Tanaka, H. & Poellinger, L. (2002) Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus, *J Biol Chem.* **277**: 32405-8.
11. Maynard, M. A., Evans, A. J., Hosomi, T., Hara, S., Jewett, M. A. & Ohh, M. (2005) Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* **19**: 1396-406.
12. Maynard, M. A., Qi, H., Chung, J., Lee, E. H., Kondo, Y., Hara, S., Conaway, R. C., Conaway, J. W. & Ohh, M. (2003) Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex, *J Biol Chem.* **278**: 11032-40.
13. Semenza, G. L. & Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol Cell Biol.* **12**: 5447-54.
14. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases, *Biochem Biophys Res Commun.* **338**: 617-26.
15. Semenza, G. L. (2001) HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus, *Cell.* **107**: 1-3.
16. Carroll, V. A. & Ashcroft, M. (2005) Targeting the molecular basis for tumour hypoxia, *Expert Rev Mol Med.* **7**: 1-16.
17. Lancaster, D. E., McDonough, M. A. & Schofield, C. J. (2004) Factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH) and other asparaginyl hydroxylases, *Biochem Soc Trans.* **32**: 943-5.

18. Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J. & Mazure, N. M. (2006) The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha, *Cancer Res.* **66**: 3688-98.
19. Mylonis, I. & Simos, G. (2012) The involvement of ERK-Hypoxia-Angiogenesis Singaling Axis anf HIF-1 in Hepatocellular Carcinoma., *Hepatocellular Carcinoma-Basic Research, Edited by Wan-Yee Lau*: 253-74.
20. Gorlach, A. & Bonello, S. (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison, *The Biochemical journal.* **412**: e17-9.
21. Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G. & Karin, M. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha, *Nature.* **453**: 807-11.
22. Papadakis, A. I., Paraskeva, E., Peidis, P., Muaddi, H., Li, S., Raptis, L., Pantopoulos, K., Simos, G. & Koromilas, A. E. (2010) eIF2{alpha} Kinase PKR modulates the hypoxic response by Stat3-dependent transcriptional suppression of HIF-1{alpha}, *Cancer Res.* **70**: 7820-9.
23. Minet, E., Mottet, D., Michel, G., Roland, I., Raes, M., Remacle, J. & Michiels, C. (1999) Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction, *FEBS Lett.* **460**: 251-6.
24. Liu, Y. V. & Semenza, G. L. (2007) RACK1 vs. HSP90: competition for HIF-1 alpha degradation vs. stabilization, *Cell cycle.* **6**: 656-9.
25. Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R. N. & Semenza, G. L. (2007) RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha, *Mol Cell.* **25**: 207-17.
26. Amir, S., Wang, R., Simons, J. W. & Mabeesh, N. J. (2009) SEPT9_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation, *J Biol Chem.* **284**: 11142-51.
27. Baek, J. H., Liu, Y. V., McDonald, K. R., Wesley, J. B., Zhang, H. & Semenza, G. L. (2007) Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase-1 binds to hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and RACK1 and promotes ubiquitination and degradation of HIF-1alpha, *J Biol Chem.* **282**: 33358-66.
28. Lyberopoulou, A., Venieris, E., Mylonis, I., Chachami, G., Pappas, I., Simos, G., Bonanou, S. & Georgatsou, E. (2007) MgcRacGAP interacts with HIF-1alpha and regulates its transcriptional activity, *Cell Physiol Biochem.* **20**: 995-1006.
29. Lyberopoulou, A., Mylonis, I., Papachristos, G., Sagris, D., Kalousi, A., Befani, C., Liakos, P., Simos, G. & Georgatsou, E. (2013) MgcRacGAP, a cytoskeleton regulator, inhibits HIF-1 transcriptional activity by blocking its dimerization, *Biochim Biophys Acta.* **1833**: 1378-87.
30. Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J. & Kim, K. W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation, *Cell.* **111**: 709-20.
31. Wei, W. & Yu, X. D. (2007) Hypoxia-inducible factors: crosstalk between their protein stability and protein degradation, *Cancer Lett.* **257**: 145-56.
32. Brahimi-Horn, C., Mazure, N. & Pouyssegur, J. (2005) Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications, *Cell Signal.* **17**: 1-9.

33. Berchner-Pfannschmidt, U., Yamac, H., Trinidad, B. & Fandrey, J. (2007) Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2, *J Biol Chem.* **282**: 1788-96.
34. Lisy, K. & Peet, D. J. (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity, *Cell Death Differ.* **15**, 642-9.
35. Bae, S. H., Jeong, J. W., Park, J. A., Kim, S. H., Bae, M. K., Choi, S. J. & Kim, K. W. (2004) Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity, *Biochem Biophys Res Commun.* **324**: 394-400.
36. Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J. & Brahimi-Horn, M. C. (2007) SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity, *Biochem Biophys Res Commun.* **360**: 646-52.
37. Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G. K., Holsboer, F. & Arzt, E. (2007) RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia, *Cell.* **131**: 309-23.
38. Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. & Yeh, E. T. (2007) SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia, *Cell.* **131**: 584-95.
39. Mottet, D., Ruys, S. P., Demazy, C., Raes, M. & Michiels, C. (2005) Role for casein kinase 2 in the regulation of HIF-1 activity, *Int J Cancer.* **117**: 764-74.
40. Cho, H., Ahn, D. R., Park, H. & Yang, E. G. (2007) Modulation of p300 binding by posttranslational modifications of the C-terminal activation domain of hypoxia-inducible factor-1alpha, *FEBS Lett.* **581**: 1542-8.
41. Flugel, D., Gorchach, A., Michiels, C. & Kietzmann, T. (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner, *Mol Cell Biol.* **27**: 3253-65.
42. Kalousi, A., Mylonis, I., Politou, A. S., Chachami, G., Paraskeva, E. & Simos, G. (2010) Casein kinase 1 regulates human hypoxia-inducible factor HIF-1, *J Cell Sci.* **123**: 2976-86.
43. Warfel, N. A., Dolloff, N. G., Dicker, D. T., Malysz, J. & El-Deiry, W. S. (2013) CDK1 stabilizes HIF-1alpha via direct phosphorylation of Ser668 to promote tumor growth, *Cell cycle.* **12**: 3689-701.
44. Cam, H., Easton, J. B., High, A. & Houghton, P. J. (2010) mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha, *Mol Cell.* **40**: 509-20.
45. Xu, D., Yao, Y., Lu, L., Costa, M. & Dai, W. (2010) Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha, *J Biol Chem.* **285**: 38944-50.
46. Depping, R., Steinhoff, A., Schindler, S. G., Friedrich, B., Fagerlund, R., Metzen, E., Hartmann, E. & Kohler, M. (2008) Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): involvement of the classical importin alpha/beta pathway, *Biochim Biophys Acta.* **1783**: 394-404.
47. Chachami, G., Paraskeva, E., Mingot, J. M., Braliou, G. G., Gorlich, D. & Simos, G. (2009) Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7, *Biochem Biophys Res Commun.* **390**: 235-40.
48. Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. & Michiels, C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation, *FEBS Lett.* **468**: 53-8.
49. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S. & Simos, G. (2006) Identification of MAPK

phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α , *J Biol Chem.* **281**: 33095-106.

50. Dimova, E. Y., Michiels, C. & Kietzmann, T. (2009) Kinases as upstream regulators of the HIF system: their emerging potential as anti-cancer drug targets, *Curr Pharm Des.* **15**: 3867-77.

51. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption, *Cell Metab.* **3**: 187-97.

52. Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J. W., Shimoda, L., Dang, C. V. & Semenza, G. L. (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells, *Cell.* **129**: 111-22.

53. Semenza, G. L. (2010) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene.* **29**: 625-34.

54. Poon, E., Harris, A. L. & Ashcroft, M. (2009) Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer, *Expert Rev Mol Med.* **11**: e26.